THORKILD STEENBERG
BIOLOGI
KOMPENDIUM

B I O L O G I

Ung tudse

BIND III

SMÅFORSØG

Indhold

Mikroskopering af celletyper

1	*Mundslimhindeceller*	*side 3*
2	*Vandpestblade*	*side 7*
3	*Bakterier*	*side 10*
4	*Infusionsdyr*	*side 12*
5	*Alger*	*side ?*

Fotosyntese

1	*Sachs's jodprøve*	*side 16*
2	*Fluorescens af klorofyl*	*side 18*
3	*Spalteåbninger i blade*	*side ?*

Mikrobiologi

1	*Fremstilling af tykmælk*	*side 21*
2	*Undersøgelse af bakterietal i kød eller andre madvarer*	*side 22*

Fysiologi

1	*CO_2 produktion i gærceller*	*side ?*

ThorkildSteenberg

2.udg.2009

Indledning

Hæftet indeholder en række små, enkle forsøg indenfor fysiologi, genetik, mikrobiologi og økologi, der kan supplere eller være forløber for de mere omfattende forsøg i økologi - og fysiologi-forsøgshæfterne.

Samlingen rummer forslag til iagttagelse af mikroverdenen ved mikroskopering og farvning af celler - levende organismer set i mikroskop er uforlignelig biologi; gamle klassiske forsøg med en historie; praktisk mikrobiologi; etc.

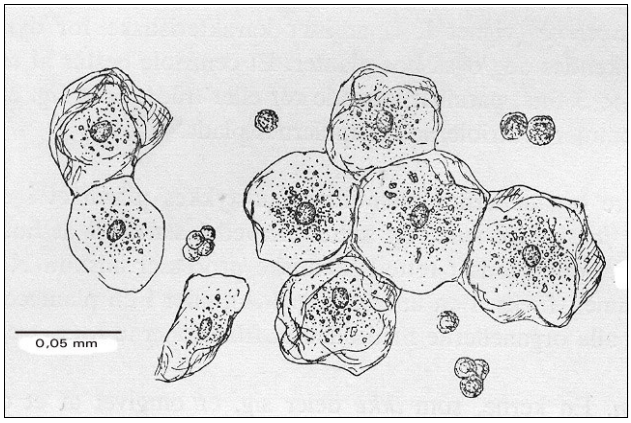
□ □ □

Mikroskopering af celletyper

I	Mundslimhindeceller
II	Celler i vandpestblade
III	Bakterier
IV	Infusionsdyr
V	Alger og dyreplankton

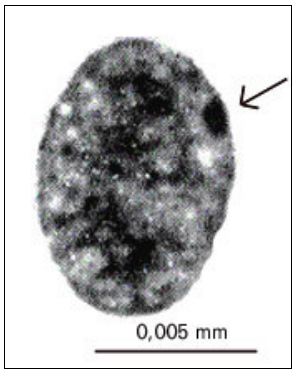
I Mundslimhindeceller

Skrab med en tændstik el. lign. lidt celler af kindens inderside.
Fiksér præparatet ved kortvarigt at trække objektglasset gennem flammen fra en bunsenbrænder (med cellerne opad! - figur 6-3).
Dryp et par dråber methylenblåt opløsning på cellerne og lad præparatet hvile et par minutter.
Skyl forsigtigt med vand og mikroskopér uden dækglas. Cellekernerne farves tydeligt blå. ***(3)***.



Figur 1 Mundslimhindeceller. De små celler er hvide blodlegemer. ***(1)***

Da kvindens ene X - kromosom inaktiveres i de fleste celler og ligger som en lille mørktfarvet plet i kanten af cellekernen - et ***Barr-legeme*** - kan man med lidt tålmodighed afgøre om cellerne kommer fra en kvinde eller en mand:



*Figur 2 Cellekerne med Barr-legeme (ved pilen)(**2**)*

Barr-legeme tilstede	➜	**to X-kromosomer**	➜	**kvinde**
intet Barr-legeme	➜	**kun et X-kromosom**	➜	**mand**

Fra 1968 til 1991 var en positiv kønstest, gennemført på ovenstående måde, en betingelse for at en kvinde kunne stille op i internationale sportskonkurrencer.
Ideen bag testen var at udelukke mænd og andre deltagere, hvis kropsstruktur og muskelstyrke var af mandlig type eller unormal på anden måde, fra kvindernes konkurrencer og dermed undgå ulige konkurrencebetingelser.
Kønstesten har dog i tidens løb været massivt kritiseret for kun at skelne mellem mænd og kvinder på det mest simple niveau i kønsbestemmelsen.
Følgende eksempler illustrerer problemerne:

1. *Normale kvinder som ved hjælp af hormoner har øget muskelmassen. Positiv test*
2. *Kvinder med en medfødt binyrelidelse som betyder maskulinisering og dermed øget muskelmasse: 46,XX. Positiv test*
3. *Mænd: 46,XY. Negativ test*
4. *Mænd med et ekstra X-kromosom: Klinefelter mænd - 47,XXY. Positiv test*
5. *Kvinder med et X-kromosom for lidt: Turner kvinder - 45,X0. Negativ test*
6. *Personer med testikulær feminisering: 46,XY, fremtræder som kvinder men test negativ.*

Kønsbestemmelsen indeholder fire elementer:

- *Kromosomalt køn: XX eller XY*
- *Ovarie og testikelfunktion (gonadalt køn)*
- *Sekundære kønskarakterer: muskelmasse, kropsudvikling, kropsform, m.m.*
- *Kønsidentitet: udseende og optræden (psykosocialt køn).*

Kønstesten omfatter kun det kromosomale køn, medens det bestemmende for en persons optræden i enten kvinde- eller mandskonkurencer logisk må være en kombination af personens sekundære kønskarakterer - muskelstyrke og kropsform - og personens kønsidentitet som det giver sig udtryk i udseende og optræden.

*Fra 1991 anvendtes testen kun stikprøvevis, og fra 2000 er testen endeligt opgivet (**4 og 5**).*

Referencer og billedrefencer

1 **Mogens Lund**: *Biologi*; Gyldendal. 1970.
2 **Adrian M.. Srb, Ray D. Owen & Robert S. Edgar**: *General Genetics*; W.H.. Freeman & Co. 1965 (efter M.L. Barr).
3 **Knud Hemminsen**: *Øvelser i biologi*; V.Richters Forlag. 1968
4 **Albert de la Chapelle**: *The Use and Misuse of Sex Chromatin Screening for 'Gender Identification' of Female Athletes*; J. Amer. Med. Ass. 256, pp: 1920-1923. 1986
5 **Internetside**: www.activeaustralia.org/women/verification.htm

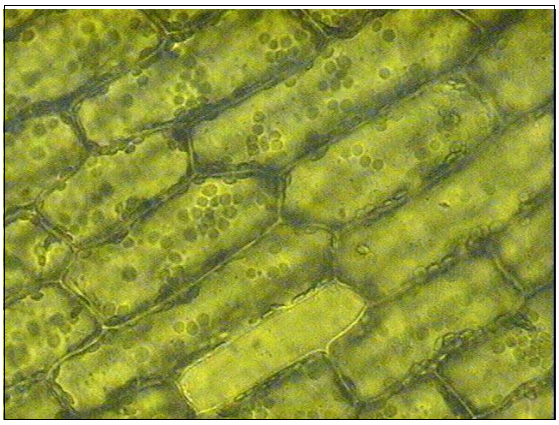
□ □ □

II Celler i vandpestblade

Materialer: *blade fra vandpest,*
mikroskop, objektglas, dækglas, filtrerpapir,
farvereagenser: *methylgrønt-eddikesyre opløsning,*
karmin-eddikesyre opløsning,
2% eddikesyre, 10% sukkeropløsning (eller 5% saltopløsning)

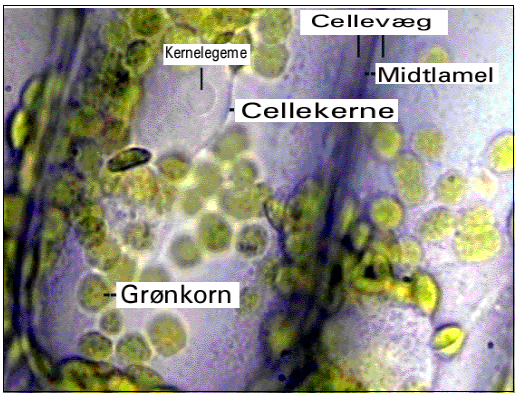
1 Læg et blad fra skudspidsen af en vandpestplante i en dråbe vand på et objektglas.
Læg et dækglas over og sug evt. overskydende vand væk med et stykke filtrerpapir.
Mikroskopér ved lav forstørrelse (***9***).

Hvad er de små grønne legemer inde i cellerne?
Hvor mange er der i en celle?
Hvor mange lag celler er der i bladet?



Figur 3 Vandpestceller i vand. (x 400)

2 Prøv ved større forstørrelse at iagttage detaljer i cellerne:
Læg bladet i en dråbe <u>methylgrønt-eddikesyre opløsning</u> i stedet for i vand.
Læg dækglas på og mikroskopér.



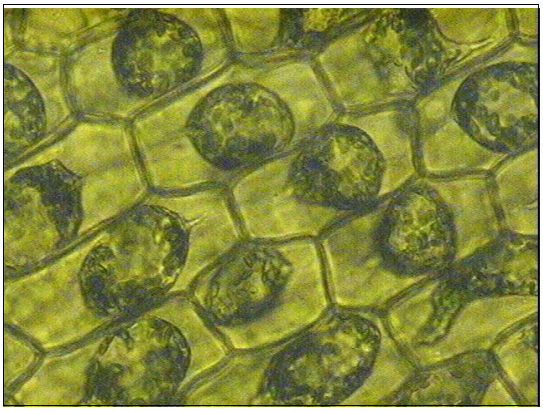
Figur 4 Vandpestceller ved stor forstørrelse. Cellekernen kan ses. (x 1000) (6)

I løbet af et par minutter farves cellekernen kraftigt blågrøn, cellevæggen farves mindre kraftigt og celleindhold er ufarvet.
Når farvningen er passende kan kontrasten øges ved at suge en dråbe 2% eddikesyre gennem præparatet. Anbring en dråbe af eddikesyreopløsningen langs den ene side af dækglasset og sug den gennem præparatet ved hjælp af et stykke filtrerpapir langs den modsatte side af dækglasset.

Hvis der anvendes <u>karmin-eddikesyre opløsning</u> i stedet for, farves kernerne røde (***8***).

3 Sug på tilsvarende måde en 10 % sukkeropløsning eller en 5 % saltopløsning gennem et præparat, lavet som beskrevet under punkt 1.

Hvad sker der?
Hvordan kan det forklares?



Figur 5 Vandpestceller i saltvand. (x 400)

Referencer og billedreferencer

6 www.lima.ohio-state.edu/biology/images/chlorop.jpg

8 **Joachim Müller & Erich Thieme**: *Biologische Arbeitsblätter*; Industrie-Druck Verlag 1964.

9 **S.E. Abrahamsen**. *Biologisk mikroskopi*; Jul. Gjellerus Forlag. 1968

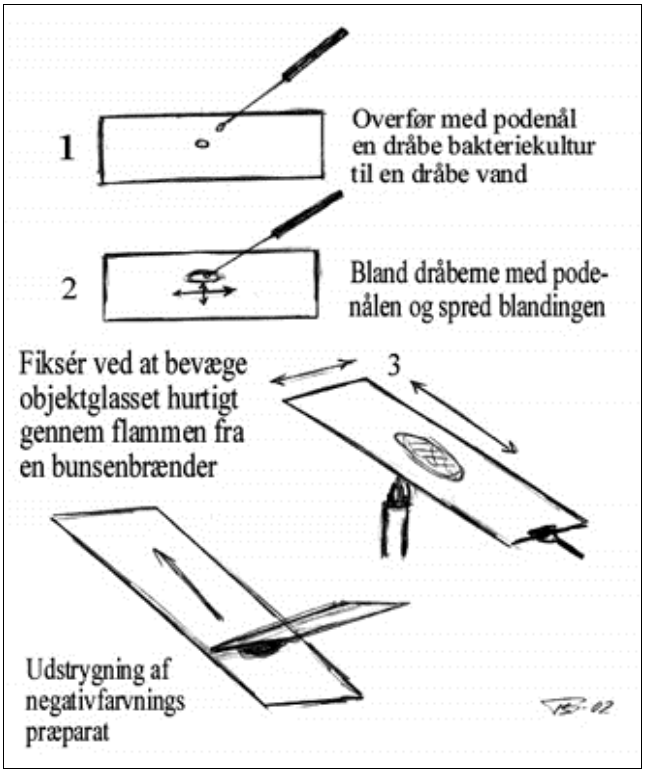
□ □ □

III Bakterier

Materialer: *stort bægerglas, en håndfuld græs eller hø,*
bunsenbrænder, alkohol, pincet,
objektglas, dækglas og mikroskop,
farvereagenser: karbol-fuchsin opløsning[1]*,*
nigrosin opløsning,
methylenblåt opløsning[2]

1 Fremstilling af en bakteriekultur:

Kom en håndfuld græs eller hø i et stort bægerglas og hæld ledningsvand i til indholdet er dækket.
Stil glasset ved stuetemperatur uden låg.
Efter nogle dage er der dannet en bakteriehinde i overfladen.Kulturen indeholder bl. a den stavformede bakterie Bacillus subtilis (hø-bakterie). (***10 og 11***)



Figur 6 Fremstilling af bakteriepræparat og udstrygning til negativfarvning

---

[1] Ziehl-Neelsen Karbol-Fuchsin opløsning fortyndet med destilleret vand 1:4

[2] 0,3 g methylenblåt opløses i 30 ml 96% alkohol. Fortyndes med destilleret vand 1:4

2 Farvning og mikroskopering:

Et objektglas affedtes ved rensning i alkohol. Objektglasset tages op med en ren pincet og aftørres med et rent viskestykke.
Objektglasset flamberes (føres hurtigt gennem en bunsenbrænders flamme) og afkøles.

Farvning:

Læg en dråbe vand på et objektglas og overfør ved hjælp af en podenål en smule af bakteriehinden fra kulturglasset (bøj nålen til et øje, figur 6-1).
Bland vanddråbe og bakterier med podenålen, spred blandingen ud i et tyndt lag og lad den lufttørre (figur 6-2).
Fiksér præparatet ved at føre objektglasset hurtigt gennem flammen fra en bunsenbrænder (figur 6-3).

A Tilsæt karbol-fuchsin opløsning så præparatet er dækket.
Lad farven virke i 4-5 minutter og skyl derefter forsigtigt farven af objektglasset.
Lad præparatet tørre og mikroskopér. Bakterierne er farvet kraftigt røde.

B Alternativt kan bakterierne farves med methylenblåt opløsning. Bakterierne fremtræder blåfarvede.

Negativ farvning:

Bakterierne farves ikke, men fremtræder lyse på mørk baggrund. Hertil anvendes nigrosinopløsning.
En dråbe bakterier fra kulturglasset overføres til en dråbe nigrosinopløsning med en podenål (form et øje på podenålen). Bland grundigt og stryg ud i et tyndt lag på objektglasset (brug kanten af et andet objektglas til at fange dråben i en spids vinkel og stryg væk fra dråben).
Præparatet lufttørres og mikroskoperes uden dækglas.

Referencer:

10 **Joachim Müller & Erich Thieme**: *Biologische Arbeitsblätter*; Industrie-Druck Verlag .1964
11 **A. Munk**. *Mikrobiologi*; Jul. Gjellerus Forlag. 1965
12 **John P. Harley & Lansing M. Prescott**: *Laboratory Exercises in Microbiology*; Wm. C. Brown Publ., 2. ed. 1993

IV Infusionsdyr

Materialer: *stort bægerglas, en håndfuld hø, et par gulerodsstykker,*
sø- eller damvand, evt. vandplanter,
objektglas, dækglas og mikroskop.

1 Fremstilling af en infusionsdyrkultur:

Kom en håndfuld hø i et stort bægerglas, tilsæt et par skiver gulerod og evt dele af vandplanter og hæld sø- eller damvand i til indholdet er dækket.
Stil glasset lyst - men uden direkte sol - ved stuetemperatur uden låg.
Efter nogle dage er der dannet en bakteriehinde i overfladen. Efter et par ugers henstand er der i hinden desuden en rig bestand af forskellige infusionsdyr.
Kulturen går i stå efter 3-4 uger (***13***).

2 Mikroskopering:

Kom en dråbe af kulturhinden på et objektglas. Læg dækglas over og mikroskopér.
Der kan være andre typer knyttet til plantematerialet i kulturen: tag en lille stykke plantemateriale sammen med lidt vand og mikroskopér.

Referencer:

13 **Joachim Müller & Erich Thieme**: *Biologische Arbeitsblätter*; Industrie-Druck Verlag .1964
14 **S.E. Abrahamsen**. *Biologisk mikroskopi*; Jul. Gjellerus Forlag. 1968

□ □ □

V Alger og dyreplankton

□ □ □

Fotosyntese

I Sachs' jodprøve
II Fluorescens af klorofyl

I Sachs' jodprøve

Et gammelt, elegant, klassisk forsøg udført af Julius Sachs i 1862 til demonstration af at planter i lys laver stivelse (***15, 16***).
Forsøget er en del af den række af eksperimenter og teorier der langsomt førte frem til den viden om og opfattelse af fotosyntesen, vi har i dag ***(17)***

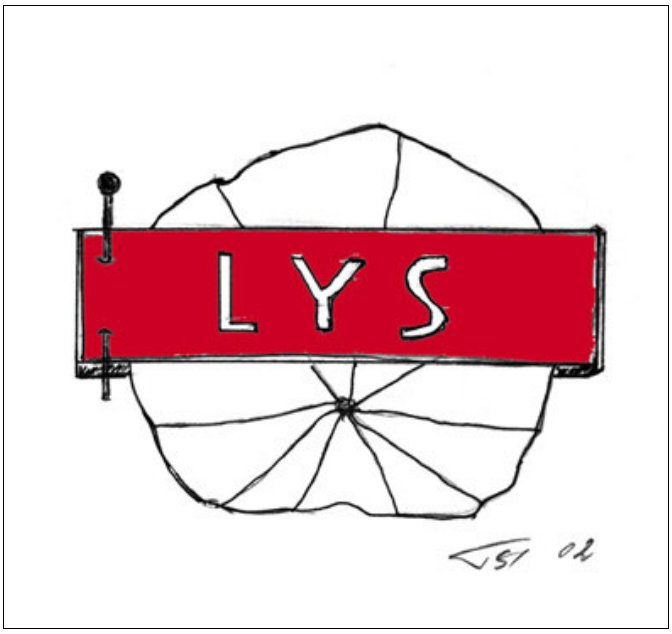
Materialer: *potteplante: Pelargonie eller Tropaeolum*
pap, 96% alkohol, demineraliset vand,
jod-jodkalium opl.(farver stivelse blåsort),
to store bægerglas, petriskål, pincet,
varmeplade eller bunsenbrænder og trefod.

Fremgangsmåde:

Klip en skærm af et stykke pap, således at den er en halv cm større end bladets dobbelte bredde.
Fold skærmen sammen, klip et mønster i den og sæt skærmen over bladet.
Hæft skærmens åbne ender sammen uden for bladet med en nål.
Sæt planten i dagslys.

Næste dags eftermiddag (ca 10 timers lys efter en nats mørke) dyppes bladet i kogende vand i et bægerglas.
Bladet lægges derefter i varm alkohol i et andet bægerglas indtil alt farvestof er udtrukket.
Bladet skylles let og anbringes i en petriskål med J-JK reagens.
Iaggtag hvad der sker!

Hvilke(n) hypotese(r) ligger til grund for forsøget?



Figur 7 Tropaeolum blad dækket med en skærm hvori der er klippet et mønster.

Referencer:

15 **V. Abrahamsen, Tyge W. Böcher & Poul Larsen**: *Plantelivet*; P. Haase & Søn, 6. udg. 1967
16 **Eug. Warming**: *Den almindelige Botanik*

II Fluorescens af klorofyl

Klorofylmolekylerne i grønkornene er organiseret i komplekser centreret om et centralt klorofylmolekyle. Når klorofylkomplekserne absorberer lysenergi ledes energien til de centrale klorofylmolekyler, hvor den anvendes til at anslå elektroner, som overføres til fotosyntesens enzymsystemer.
Hvis klorofylmolekylerne er fysisk adskilt fra enzymerne kan de ikke videregive elektronerne og afgiver derfor energien, når elektronerne falder tilbage i normaltilstanden, som lys - fluorescens med en bølgelængde på ca 700 nm..

Materialer: *ekstrakt af klorofyl fx fra foregående forsøg, eller friske blade, bægerglas, alkohol og varmeplade, UV-lampe.*

Fremgangsmåde:

Hvis klorofylektrakten fra foregående forsøg ikke kan anvendes fremstilles en tilsvarende ved at opvarme et par blade i alkohol på en varmeplade til al farvestoffet er udtrukket.

Belys klorofylekstrakten med UV-lys i et mørkelagt rum og iagttag farven af det udsendte lys.

□ □ □

Mikrobiologi

I Fremstilling af tykmælk
II Undersøgelse af bakterietal i kød eller andre madvarer

I Fremstilling af tykmælk

Følgende er citat fra min farmors kogebog *(19)*:

> *"God Tykmælk bør nydes daglig Aaret rundt. Serveret med revet Rugbrød og Sukker er den en sund Dessert og den bedste Ret at begynde Dagen med, og en ret, som Børn gerne spiser.*
>
> *Hvis man har Centralvarme eller Stedsebrændere, volder det ingen Vanskeligheder at faa Mælken tyk fra Dag til Dag, selv i den strengeste Vintertid. Hvor saadanne Varmekilder mangler; men hvor der haves Elektricitet, kan Varmeskab benyttes.*
>
> *Første Gang, man skal lave Tykmælk, er det nødvendigt tilsætte Sødmælken lidt god Kærnemælk (1 Spiseskefuld pr. Tallerken), men har man først en god Tykmælk, kan denne benyttes til at pode den næste Mælk med.*
>
> *Den bedste Tykmælk faas af lavpasteuriseret Sødmælk. Man kan selv pasteurisere den raa Mælk ved at opvarme den ca 5 Minutter til 68° - 70°. Naar denne Mælk er afkølet til 30° - 25°C, podes den paa ovennævnte Maade.*
>
> *Hvis Mælken ikke bliver tyk ved 20°C paa 18 timer, eller hvis tykmælken faar afsmag, udskiller Valle eller har Luftblærer eller Skimmel paa Overfladen, bør den næste Gang podes med ny Kærnemælk."*

Materialer: 1l økologisk (uhomogeniseret) sødmælk,
1 dl økologisk kærnemælk,
tykmælkstallerkener.

Fremgangsmåde:

Bland mælk og kærnemælk omhyggeligt med en ske. Hæld blandingen op i tykmælkstallerkener og sæt dem i varmeskab (20°C) i 18 timer.
Smag!
Lav et præparat af en dråbe kærnemælk som vist på side 10. Hvad ser man?

Referencer:

19 **Carla Meyer (red.):** *Nutids Mad og Husførelse*; Gyldendal 2. udg. 1936
20 **Knud Hemmingsen:** *Øvelser i biologi*; V. Richters Forlag. 1968

□ □ □

II Undersøgelse af bakterietal i kød eller andre madvarer

Princippet i undersøgelsen er at udså en kendt mængde prøve i et vækstmedium (agar) og lade de tilstedeværende bakterier vokse til synlige kolonier som så tælles (man regner med at én koloni stammer fra én bakterie).
Prøven skal være fortyndet så meget, at der er et passende antal kolonier at tælle (10-200).

Metoden kaldes Koch´s pladespredningsmetode - opkaldt efter den tyske mikrobiolog Robert Koch (1843-1910), der i 1880' erne arbejdede med isolering og dyrkning af flere sygdomsfremkaldende bakterier (bl.a. miltbrand og tuberkulose).
Han grundlagde sammen med Louis Pasteur den moderne mikrobiologi og dens metoder.

Materialer

Sterile petriskåle, steril skalpel, steril kraftig plasikpose, sterile pippetter (5 stk målepippetter og 1 (3) stk fuldpippette), pippettebold, vækstmedium og fortyndingsmedium.

Vækstmedium:

Pepton	*5,0 g*
Gærekstrakt	*2,5 g*
Dextrose	*1,0 g*
Agar	*9,0 g*
Vand	*1000,0 g*

Fortyndingsmedium:

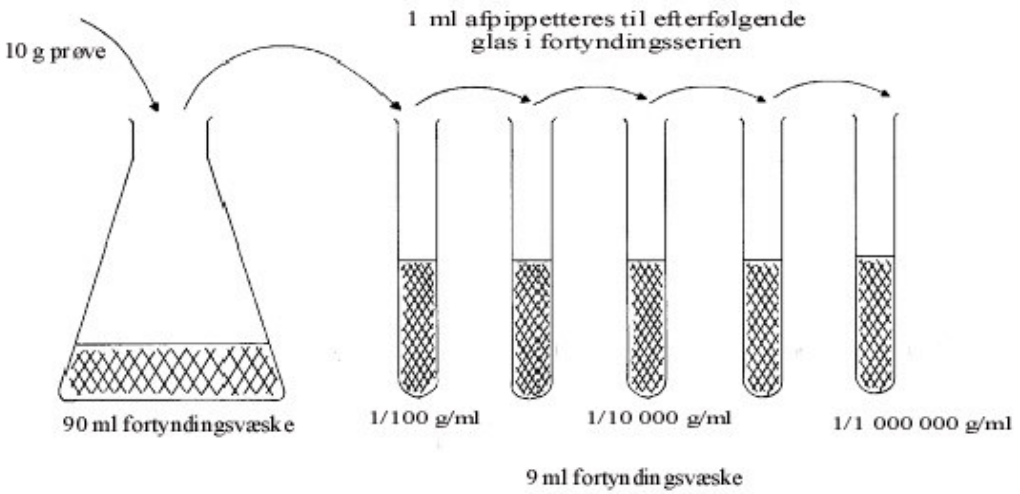
samme sammensætning uden agar.

Afvej ingredienserne i et bægerglas og opvarm til kogepunktet (det er lettere at opløse agaren ved først at tilsætte den når væsken koger).
Autoclavér ved 121 °C i 15 min.

Fremgangsmåde

Lav en fortyndingsserie af 5 reagensglas med 9,0 ml fortyndingsmedium i. Mærk dem 2 til 6 (fortyndingen i dem er 10^{-2} til 10^{-6}).

Mærk et antal petriskåle i bunden med tallene 4, 5 og 6.



Figur 8 Fortyndingsserie til bakterietælling

5-10 g prøve (den nøjagtige vægt noteres) udtages med steril kniv forskellige steder i prøvematerialet og overføres til 90 ml steril fortyndingsvæske i en svær plastikpose. Plastikposen bearbejdes kraftigt og omhyggeligt, således at prøven bliver så findelt som muligt. Overfør med steril pippette 1 ml til til første glas i fortyndingsserien, omryst (med parafilm over glasmundingen) og overfør dernæst 1 ml (ny pippette!) til andet glas i fortyndingsserien. Således fortsættes til sidste glas.

Fra hvert af de tre sidste glas (4, 5 og 6) afpippetteres 1 ml til tomme petriskåle med samme nr, som derefter tilsættes 10-15 ml flydende agar (temperatur ikke over 45 °C).
Bland fortynding og agar omhyggeligt med roterende bevægelser af skålen, men uden at agaren skvulper op på låget.
Skålene sættes i varmeskab ved 30 °C med bunden opad.

Resultatbehandling

Tæl antallet af kolonier på skålene og beregn det sandsynlige antal bakterier pr g prøve.

Referencer:

21 *Handbook of Microbiological Culture Media, Int. Ed.*

Fysiologi

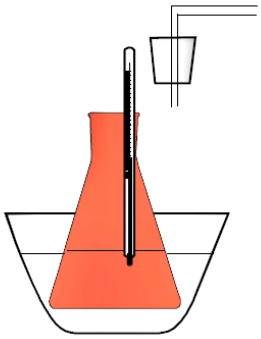
I Måling af CO_2 produktion gærceller som funktion af temperatur
II

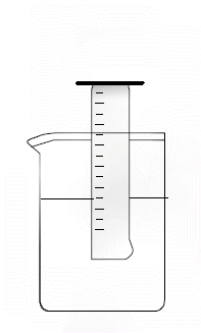
I Måling af CO_2 produktion i gærceller som funktion af temperaturen

Gærceller producerer CO_2 ved respiration eller gæringsproces.
I forsøget undersøges en gæropslemnings CO_2 produktionen ved forskellige temperaturer.

Materialer

vandbad til temperaturregulering (plastikbalje eller lignende med temperatur 10 °C, 20 °C, 30 °C , 40°C, 50 °C og 60 °C)
gær, sukker
400 ml konisk kolbe, gummiprop forsynet med glasrør, plastikslange
100 ml måleglas, 500 ml bægerglas
termometer





Fremgangsmåde

1. Opløs 10 g gær i 125 ml vand i kolben. Tilsæt 10 sukker.

2. Placer kolben i et vandbad med fx temperaturen 10 °C
3. Sæt termometeret ned i kolben og vent til temperaturen i gæropslemningen har stabiliseret sig - notér temperaturen.
4. Sæt proppen i og før slangen op i et omvendt måleglas fyldt med vand - placeret i et vandfyldt bægerglas.
5. Mål CO_2 udskillelsen i 5-10 min (notér tiden).
   Der skal måske tilføjes varmt eller koldt vand til vandbadet under forsøget for at holde temperaturen stabil. Notér evt. temperaturudsving.

Flyt kolben over i et vandbad med en ny temperatur og gentag 3. - 5. Samme gæropslemning kan bruges til flere forsøg, hvis der startes med de lave temperaturer.

Resultatbehandling

Tegn digram over CO_2 produktionen som funktion af temperaturen.

Diskussion

hvad er gærceller?
hvorfor skal gærceller opløses i vandet i kolben før der til sættes sukker (jvf. punkt 1)?