



Debbie Eldridge

Science and Plants for Schools, Homerton College
Hills Road, Cambridge CB2 8PH UK

Badanie fotosyntezy

Immobilizacja komórek glonów w celu badania fotosyntezy

Cel

Wprowadzenie do ilościowego badania procesu fotosyntezy, które inspiruje i pozwala na dalsze samodzielne rozwijanie prowadzonych doświadczeń.

Wstęp

Zwykle badania fotosyntezy w szkołach opierają się na badaniu wydzielania tlenu przez moczarkę kanadyjską (*Eloдея canadensis*) lub na wykrywaniu skrobi w odbarwionych liściach fasoli. W obu metodach trudno o dane ilościowe, a drugie doświadczenie często wprowadza uczniów w błąd.

Niniejsze doświadczenie prowadzone na unieruchomionych w alginianie wapnia glonach, którym dostarczamy określoną ilość substratów fotosyntetycznych, pozwala na pół ilościowe badanie intensywności fotosyntezy. Wykonuje się je przez obserwację zmiany barwy wskaźnika wykrywającego wodorowęglan w roztworze. Intensywność fotosyntezy mierzy się stopniowym zużyciem dwutlenku węgla przez zimmobilizowane komórki glonów. Pomiar wykonujemy kolorymetrem lub po prostu porównujemy z przygotowaną wcześniej skalą. Metodą tą można badać wpływ długości fali świetlnej, wpływ temperatury czy gęstości hodowli komórek na fotosyntezę. Testować można także inne gatunki glonów lub sinic.



Scenedesmus quadricauda, glon, który tworzy czterekomórkowe kolonie, idealnie nadaje się do tego doświadczenia.

Sprzęt i materiały

Dla każdej osoby lub zespołu

Sprzęt

- Plastikowa strzykawka o pojemności 10 ml (bez igły)
- 2 małe zlewki lub kubeczki plastikowe
- Cylinder miarowy o pojemności 100 ml
- Małe sitko
- Szklana bagietka lub plastikowe mieszadło
- 8 zakręcanych małych, przezroczystych buteleczek o pojemności 5 - 7 ml
- Lampa stołowa
- Linijka
- Dostęp do kolorymetru lub wzorcowy zestaw roztworów wskaźnika (patrz niżej)
- OPCJONALNIE: kolorowe filtry w przypadku badania wpływu długości fali świetlnej (patrz dostawcy)

Materiały

- 3% roztwór alginianu sodu, 3 ml
- 2% roztwór chlorku wapnia, 100 ml
- Zawiesina glonów np. *Scenedesmus quadricauda*, 50 ml (zagęszczona do objętości 3 ml)
- Roztwór wskaźnika wodorowęglanów, ok. 45 ml

Dla całej klasy

Wskaźnik obecności wodorowęglanów

Przygotowanie 1 litra roztworu stężonego 10x

- Barwnik Cresol red 0,1 g
- Barwnik Thymol blue, 0,2 g
- Wodorowęglan sodu NaHCO_3 0,85 g
- Etanol 20 ml
- Świeżo zagotowana woda destylowana ok.1 litr

- 1 Rozpuść 0,1 g barwnika Cresol red i 0,2 g barwnika Tyhmol blue w 20 ml etanolu.
- 2 Rozpuść 0,85 g wodorowęglan sodu w ok. 200 ml świeżo zagotowanej (a zatem pozbawionej CO_2) wodzie destylowanej.
- 3 Zmieszaj oba roztwory i dopełnij do objętości 1 litra świeżo zagotowaną wodą destylowaną.
- 4 Przed użyciem rozcieńcz mieszaninę dziesięciokrotnie (dodaj jedną część mieszaniny i dziewięć części świeżo zagotowanej wody destylowanej) i ustaw pH do wartości 7,4.

Uwaga

Wskaźnik wodorowęglanów jest bardzo wrażliwy na zmiany pH, dlatego niezmiernie istotne jest przemywanie na wstępie wszystkich naczyń odrobiną roztworu wskaźnika.



Przygotowanie roztworów wzorcowych

Jeśli nie masz dostępu do kolorymetru, należy przygotować wzorcowe roztwory wskaźnika, aby móc przeprowadzić pół-ilościowe badanie zużycia dwutlenku węgla poprzez porównanie ze znaną skalą kolorów wskaźnika. Aby zaprezentować zmienność wskaźnika w zakresie pH 7,6 - 9,2 należy przygotować roztwory w buforze boranowo - boraksowym o odpowiednich wartościach pH.

- 9 zakręcanych przezroczystych probówek o pojemności 10 ml
 - Kwas borowy 12,4 g
 - Uwodniony czteroboran sodowy (Boraks - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$) 19,5 g
 - Stężony 10x roztwór wskaźnika wodorowęglanów, 9 ml
- 1 Przygotuj roztwory kwasu borowego oraz boraksu rozpuszczając każdą z odważonych porcji w litrze wody destylowanej lub dejonizowanej.
 - 2 Do 25 ml roztworu kwasu borowego dodawaj kolejne objętości roztworu boraksu zgodnie z tabelą obok i rozcieńcz do końcowej objętości 100 ml wodą destylowaną lub dejonizowaną.
 - 3 Nalej po 9 ml tak przygotowanych roztworów do ampułek.
 - 4 Tuż przed doświadczeniem dodaj do każdej z nich 1 ml stężonego 10x wskaźnika wodorowęglanów. *Uczniowie powinni porównać kolory roztworów w poszczególnych ampułkach.*

Roztwór boraksu, ml	pH
1.00	7.6
1.55	7.8
2.45	8.0
3.60	8.2
5.70	8.4
8.70	8.6
15.00	8.8
29.50	9.0
57.50	9.2

Hodowla glonów

- Dwulitrowa butelka plastikowa (może być po napoju lub wodzie)
 - Napowietrzacz akwariowy
 - Wata lub lignina
 - Żarówka energooszczędna np. 18 W (odpowiednik 100W)
 - Pożywka do hodowania glonów, 1,5 g
 - Startowa hodowla glonów *Scenedesmus quadricauda*
- 1 Do butelki plastikowej dodaj 1,5 g pożywki do hodowli glonów i 1 litr wody, zamieszaj do rozpuszczenia. *Z niektórych pożywek wytrąca się naturalny osad, który powinien być także zużyty przez glony.*
 - 2 Dodaj glony do butelki z pożywką.
 - 3 Zainstaluj w butelce napowietrzacz, który doprowadzać będzie dodatkowy, rozpuszczający się w wodzie, dwutlenek węgla i zapewni stały wzrost hodowli glonów.
 - 4 Zatkaj butelkę watą. Stale oświetlaj hodowlę jasnym światłem. Prowadź hodowlę aż do osiągnięcia ciemnego zielonego zabarwienia – może to zająć do 2 tygodni czasu. *Dobre rezultaty dają żarówki energooszczędne, najlepiej aby w miejscu prowadzonej hodowli nie było dodatkowych źródeł światła.*



UWAGA! Nie używaj lamp ze zwykłymi, rozgrzewającymi się żarówkami blisko hodowli.

Przebieg doświadczenia

- 1 Przygotuj gęstą zawiesinę glonów. Można to zrobić na dwa sposoby:
Pozostaw na noc 50 ml ciemnej zawiesiny glonów aby opadła na dno i ostrożnie wylej roztwór z nad glonów pozostawiając ok. 3 ml zawiesiny.
Lub
Zwiruj 50 ml ciemnej zawiesiny glonów przez 5 minut przy niskich obrotach, zlej płyn z nad osadu pozostawiając ok. 3 ml zawiesiny.
- 2 Wlej około 3 ml zagęszczonej zawiesiny glonów do małej zlewki i dodaj tę samą objętość roztworu alginianu sodu. Zamieszaj delikatnie do uzyskania jednolitego roztworu.
- 3 Napełnij strzykawkę mieszaniną glonów i alginianu.

Fig. 1

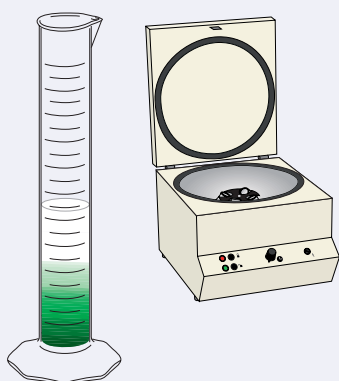


Fig. 2

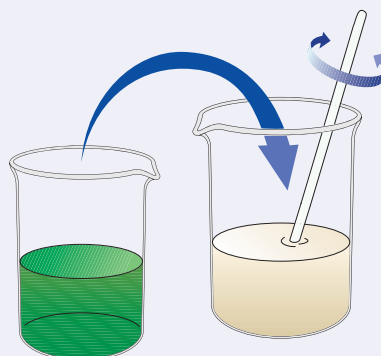
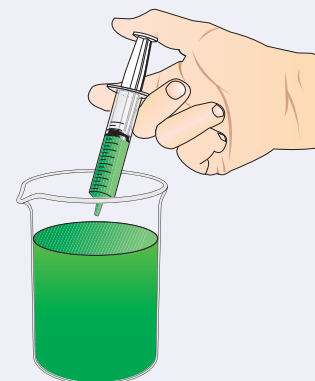


Fig. 3



- 4 Trzymaj strzykawkę nad zlewką z roztworem chlorku wapnia i dodawaj po kropli mieszaninę ze strzykawki. Od czasu do czasu delikatnie mieszaj roztwór chlorku wapnia. Każda ze spadających kropli utworzy kulkę unieruchamiając komórki glonów w alginianie sodu.
- 5 Pozostaw kulki zimmobilizowanych w alginianie glonów do stwardnienia w roztworze chlorku wapnia przez 5 - 10 minut. *Cząsteczki alginianu zostaną związane przez jony wapnia z roztworu tworząc gęstą siatkę.*
- 6 Oddziel kulki od roztworu filtrując przez sitko. Przemyj je kilkakrotnie zimną wodą z kranu, ostatni raz przemyj wodą destylowaną. *Oświetlone i nawilżane kulki mogą być przechowywane przez kilka tygodni lub, jeśli trzymane w destylowanej wodzie w lodówce, mogą przetrwać nawet kilka miesięcy. Kulki trzymane w lodówce, przed doświadczeniem powinny zostać ogrzane do temperatury pokojowej, zajmuje to ok. 30 minut.*

Fig. 4

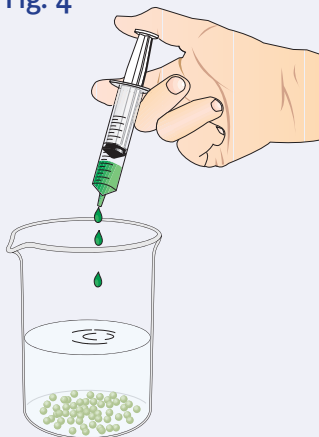


Fig. 5

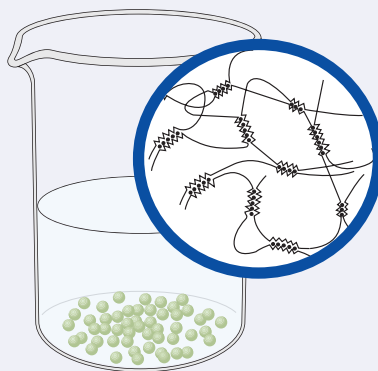


Fig. 6



- 7 Przemij wszystkie przezroczyste zakręcane małe buteleczki, w których będzie prowadzona hodowla, niewielką ilością roztworu wskaźnika wykrywającego wodorowęglany.
- 8 Do każdej butelki dodaj równą ilość kulek zimmobilizowanych glonów, następnie do każdej dodaj odmierzoną objętość roztworu wskaźnika. Zakręć butelki. *Okolo 12 - 15 kulek i 3 ml wskaźnika wystarczy na każdą butelkę.*
- 9 Postaw buteleczki z hodowlą w różnej odległości od źródła światła. Pozostaw je przez ok. 1 - 2 godziny do momentu, gdy wskaźnik w niektórych buteleczkach zmieni kolor.

Fig. 7

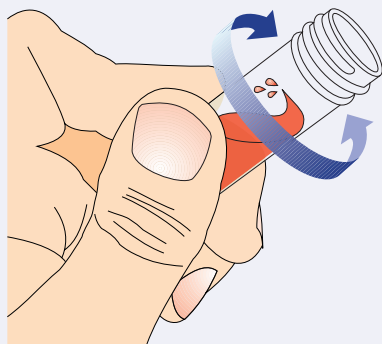


Fig. 8

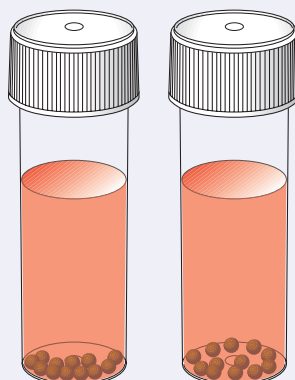
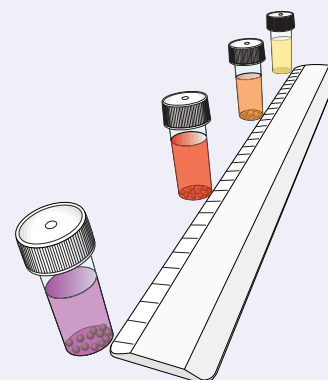


Fig. 9



- 10 Odczytaj poziom zużycia dwutlenku węgla. Można to zrobić na dwa sposoby:
Porównaj kolor wskaźnika w badanych hodowlach z przygotowanymi roztworami wzorcowymi;
- Lub**
Użyj kolorymetru w celu pomiaru absorbancji roztworów, w których prowadzona jest hodowla przy długości fali 550 nm (jest to filtr zielony).
- 11 Narysuj wykres przedstawiający zależność wartości absorbancji lub pH od intensywności oświetlenia w czasie hodowli.

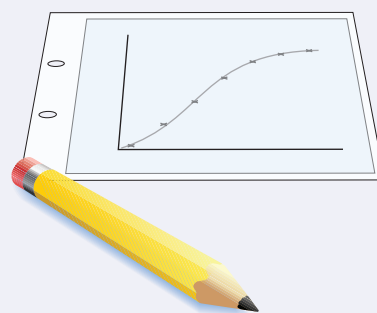
Fig. 10a



Fig. 10b



Fig. 11



Bezpieczeństwo

Hodowla glonów

Wydzielający się gaz w szklanych pojemnikach, w których prowadzona jest hodowla glonów, może stanowić zagrożenie. Upewnij się, że pojemnik ma odpowiednie odpowietrzenie.

Uważaj, aby urządzenia elektryczne - silnik pompy napowietrzającej, lampa - nie miały kontaktu z płynem, który może wyciekać z hodowli. W tym celu warto ustawić pojemnik, w którym prowadzona jest hodowla, w odpowiednio głębokiej kuwecie, a urządzenia elektryczne poza nią.

Odczynniki

Żaden ze stosowanych odczynników nie jest szkodliwy dla człowieka.

Źródła światła

Używając żarówek do oświetlenia hodowli glonów należy zwrócić należytą uwagę, aby ciepło żarówek nie rozgrzewało za bardzo butli z hodowlą, ani żadnych przedmiotów łatwopalnych. Urządzenia elektryczne należy odizolować od wody ze względu na możliwości iskrzenia lub porażenia prądem.



Czas oraz wstępne przygotowania

Hodowla glonów

Hodowla powinna być nastawiona około 2 tygodnie przed doświadczeniem. Minimum 2 godziny przed doświadczeniem należy ją pozostawić do opadnięcia komórek na dno pojemnika, warto odstawić je na noc przed planowanym doświadczeniem.

Roztwór alginianu sodu

Rozpuszczenie alginianu sodu jest czasochłonne, roztwór najlepiej przygotować dzień przed planowanym doświadczeniem. Najlepiej zostawić na noc na mieszadle magnetycznym lub w ciepłym miejscu do rozpuszczenia. W celu przechowywania roztworu przez dłuższy czas, radzimy roztwór wysterylizować w autoklawie. Przed sterylizacją należy nieco zalkalizować pH roztworu do wartości 7 - 8, aby zapobiec depolimeryzacji alginianu w wysokiej temperaturze.

Przeprowadzenie doświadczenia

Immobilizacja komórek glonów zajmuje uczniom około 15 - 20 minut, ustawienie eksperymentu około 20 - 30 minut. Zmianę zabarwienia wskaźnika obserwować możemy po upływie 1 - 2 godzin.

Rozwiązywanie problemów

Przy prowadzeniu dodatkowych doświadczeń z użyciem innych buforów, w których prowadzona jest fotosynteza, należy unikać roztworów zawierających fosforany, cytryniany i EDTA, ponieważ spowodują rozpuszczenie się kulek alginianu. Aby odzyskać komórki glonów ze złoża alginianu, należy zalać kulki 50 mM roztworem cytrynianu sodowego lub buforem fosforanowym o pH 7. W tych warunkach kulki alginianu wapnia rozpuszczą się.

Pomysły na dodatkowe doświadczenia

Opisana powyżej procedura może być stosowana w różnorodnych projektach badawczych, na przykład:

- 1 Intensywność światła**
Poprzez zamiany odległości źródła światła od hodowli lub poprzez zastosowanie różnych neutralnych, szarych filtrów.
- 2 Długość fali świetlnej**
Użyj różnokolorowych filtrów światła. Należy pamiętać, że różne źródła światła dają fale świetlne różnej długości oraz uwzględnić jaką falę przepuszczają poszczególne filtry.
- 3 Temperatura**
Zastosuj łaźnie wodne o różnych temperaturach, wstawiając do nich butelki z eksperymentalną hodowlą. Źródło światła najlepiej zainstalować od góry.
- 4 Stężenie CO₂**
Testuj różne wyjściowe stężenia CO₂.
- 5 Liczba komórek glonów**
Testowane mogą być różne stężenia komórek glonów w alginianie.

Dodatkowe źródła informacji

Eldridge, D. (2004) A novel approach to photosynthesis practicals.

School Science Review 85 (312) 37–45.

Science and Plants for Schools (SAPS)

Oryginalny protokół można znaleźć na stronie:

www.saps.plantsci.cam.ac.uk/worksheets/ssheets/ssheet23.htm

Dodatkowe informacje na temat absorpcji światła i filtrów dostępne są na:

www.saps.plantsci.cam.ac.uk/articles/broad_light.htm

Dostawcy

Zestaw doświadczalny do fotosyntezy

Zestaw materiałów i odczynników do przeprowadzenia tego doświadczenia przez 30 uczniów będzie wkrótce dostępny w Szkole Festiwalu Nauki, ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa, Polska, tel. 022 597 07 68 W: <http://www.sfn.edu.pl>

Alginian sodu

Jest odczynnikiem powszechnie używanym w przemyśle spożywczym, można go uzyskać w hurtowniach materiałów spożywczych. Odczynnik dostępny także w Szkole Festiwalu Nauki.

Kolorymetry

Proste kolorymetry firmy WPA typu CO7500Colorimeter do użytku szkolnego dostępne są w PANALYTICA, ul. Rydygiera 8, Warszawa 01-793, tel: 022 832 26 41, faks: 022 669 3967, E-mail: mail@panalytica.pl

Filtry

Dystrybutor LeeFilters: LTT Sp.z.o.o, ul. Kazimierzowska 22, 02-572 Warszawa, Tel: 00 48 22 845 0065, Fax: 00 45 22 845 0069, Email: ltt@ltt.com.pl, <http://www.ltt.com.pl>
Producentem różnorodnych filtrów jest Lee Filters, Central Way, Walworth Industrial Estate, Andover SP10 5AN, UK. W: www.leefilters.com. Na stronie internetowej znajdują się informacje o właściwościach poszczególnych filtrów. Używając filtrów szarych można zredukować ilość docierającego światła.

Sugerowane kolory filtrów

Kolor	Przepuszczana długość fali
Czerwony	700 - 630 nm
Żółty	590 - 570 nm
Zielony	570 - 490 nm
Niebieski	490 - 470 nm
Granatowy	470 - 450 nm

Glony

Hodowle startowe *Scenedesmus quadricauda* dostępne są w Szkole Festiwalu Nauki.

Hodowle startowe *Scenedesmus quadricauda* oraz innych gatunków glonów, jak również pożywki do hodowli dostępne są w Siento, 61 Bury Old Road, Whitefield, Manchester M45 6TB, UK

Neutralne, szare filtry

Kolor	Ilość światła (%)
0.15 ND	71%
0.3 ND	50%
0.6 ND	25%
0.9 ND	12,5%
1.2 ND	6,3%

Podziękowania

Protokół ten został opracowany przez Debbie Eldridge z King Ecgbert School w Sheffield dzięki nagrodzie od Schoolteacher Fellowship ufundowanej przez Science and Plants for Schools (SAPS) i Robinson College, Cambridge. SAPS jest finansowane przez Gatsby Charitable Foundation.

Adaptacja protokołu została wykonana w ramach projektu VOLVOX, finansowanego przez Komisję Europejską w 6. Programie Ramowym.

