

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
КАФЕДРА ФІЗІОЛОГІЇ ТА БІОХІМІЇ РОСЛИН

*Ю. Г. ПРИСЕДСЬКИЙ*

# **ФОТОСИНТЕЗ**

**МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК  
З ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ  
ТА САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ**



Вінниця 2016

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
КАФЕДРА ФІЗІОЛОГІЇ ТА БІОХІМІЇ РОСЛИН**

---

---

**Ю. Г. ПРИСЕДСЬКИЙ**

## **ФОТОСИНТЕЗ**

**МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК  
З ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ  
ТА САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ**

**Вінниця ДонНУ 2016**

УДК 581.131:58.08  
ББК 28.57  
П 77

Укладач: *Ю. Г. Приседський, канд. біол. наук, доц.*

Відповідальний за випуск: *Ю. Г. Приседський, канд. біол. наук, доц.*

Рецензенти: *П. П. Бігун, д-р с.-г. наук, проф. кафедри зоології ДонНУ.*

*Рекомендовано вченою радою біологічного факультету ДонНУ  
(протокол № 5 від 18 грудня 2015 р.)*

**П 77 Приседський Ю. Г.**

**Фотосинтез. Методичний посібник з виконання лабораторних робіт та самостійної роботи / Ю. Г. Приседський. – Вінниця: ДонНУ, 2016. – 68 с.**

У методичному посібнику наведено принципи методів, які використовуються для дослідження процесу фотосинтезу, та опис порядку проведення робіт з визначення вмісту фотосинтетичних пігментів, їхніх спектрів поглинання, виділення і визначення активності деяких ферментів, попередників хлорофілу та відновлювальної активності ізольованих хлоропластів. Наведені також основні методи визначення фотосинтетичної активності рослин. Подані відомості про роботу на вимірювальних приладах (спектрофотометри СФ-26 та Гранум 722, фотоелектроколориметр КФК-2 тощо).

УДК 581.131:58.08  
ББК 28.57

© Приседський Ю. Г., 2016  
© ДонНУ, 2016

## ВСТУП

Фотосинтез – найважливіший природний процес, якому належить основна роль у перетворенні енергії сонячного світла в енергію хімічних зв'язків органічних сполук (вуглеводів, білків, жирів). Фотосинтез являє собою складний комплекс фотофізичних, фотохімічних та ферментативних реакцій, які відбуваються у чіткій послідовності. Це визначає необхідність комплексного підходу до вивчення фотосинтетичного процесу з використанням фізико-хімічних, хімічних, біохімічних методів досліджень.

Залежно від характеру процесів фотосинтезу, що вивчаються, використовують різні досить складні методи досліджень. Як правило, це різні методи спектрометрії, люмінесцентний аналіз, манометрія, інфрачервоний газоаналіз, диференційне центрифугування, ізотопний радіоактивний аналіз тощо.

Під час виконання лабораторних робіт з фотосинтезу студенти повинні опанувати основні сучасні методи досліджень, які використовуються для вивчення цього процесу.

## ПРОГРАМА СПЕЦКУРСУ «ФОТОСИНТЕЗ»

### Змістовий модуль 1. Фототрофна функція рослин. Будова фотосинтетичного апарату

**Фототрофна функція.** Визначення фототрофної функції. Шляхи запасання сонячної енергії. Фотогетеротрофи і фотоавтотрофи, їхня характеристика та представники. Фоторедуктори та фотосинтетики. Задачі та перспективи вивчення фотосинтезу. Теоретичне і практичне значення його вивчення. Біофізика, біохімія та фізіологія фотосинтезу.

**Історія вивчення фотосинтезу.** Наукове передбачення повітряного живлення рослин С. Гейлсом, М. В. Ломоносовим. Відкриття фотосинтезу Дж. Прістлі. Роботи Інгенгауза, Сенеб'є, Соссюра, Буссенга, Тимірязєва. Розвиток досліджень фотосинтезу в кінці ХІХ ст. Дослідження фотосинтезу у ХХ ст.

**Значення фотосинтезу та космічна роль зелених рослин.** К. А. Тимірязєв про космічну роль зелених рослин. Сонце – джерело енергії для життя на Землі. Первинна продуктивність, її розміри. «Комора» Сонця та її розміри. Біогенне походження кисню на Землі. Зміна кліматичних умов на Землі внаслідок розвитку фотосинтетиків. Роль зелених рослин у кругообігу речовин у природі. Значення фотосинтезу для життя на Землі.

**Структура і хімічний склад фотосинтетичного апарату.** Роль цілісності рослини та її органів у процесі фотосинтезу. Листок – орган фотосинтезу. Пристосування анатомічної будови листка до виконання фотосинтетичної функції та взаємозв'язок її з транспірацією. Продиховий апарат, його будова та функції. Фактори, що регулюють відкривання та закривання продихів. Механізм продихових рухів.

Фотосинтетичний апарат прокаріот. Фотосинтетичний апарат водоростей. Хлоропласти вищих рослин. Форма та розміри, кількість у клітині. Рух хлоропластів. Будова хлоропластів. Оболонка. Матрикс або строма. Мембранні структури: ламели, тилакоїди, грани, люмен. Різні моделі просторової організації фотосинтетичних мембран. Периферичний ретикулум. Диморфізм хлоропластів. Морфогенез зелених пластид. Симбіотична теорія походження хлоропластів. Розвиток хлоропластів із пропластид. Поділ хлоропластів. Тривалість життя зелених пластид.

Молекулярна організація фотосинтетичних мембран. Різні моделі їхньої будови. Хімічний склад хлоропластів: пігменти, ліпіди, білки строми та ламел. Їхня характеристика та функції. Білоксинтезуюча система, характеристика її окремих компонентів і просторова організація. Автономність хлоропластів: її ознаки та обмеженість.

### Змістовий модуль 2. Світлова стадія фотосинтезу

**Поглинання та міграція енергії.** Первинні фотохімічні реакції. Концепція фотосинтетичної одиниці. Реакційні центри і антенні форми

хлорофілу. Уявлення про дві фотохімічні реакції та дві фотосистеми. Характеристика фотосистем. Світлозбираючий комплекс. Механізми міграції енергії до реакційного центру. Модель магнітного резонансу. Гіпотеза екситону. Збудження молекули хлорофілу.

**Електронтранспортний ланцюг та фотофосфорилування.** Шляхи реалізації збудженого стану. Транспорт електронів між двома фотосистемами. Електрон-транспортний ланцюг фотосинтезу. Z-схема. Характеристика її окремих компонентів. Кисеньвиділяючий комплекс. Циклічний, нециклічний та псевдоциклічний транспорт електронів у ЕТЛ. Фотофосфорилування та його механізм. Робота фактору супряження –  $CF_1$ –  $CF_0$ . Захисні функції каротиноїдів.

### Змістовий модуль 3. Темнова стадія фотосинтезу

**Вторинні реакції фотосинтезу** – асиміляція  $CO_2$ . Цикл Кальвіна – С3-шлях фотосинтезу. Реакції циклу. С4-шлях та його значення. САМ-метаболізм та його значення. Фотодихання. Його механізм і роль у життєдіяльності рослин. Використання енергії світла на процеси, що не пов'язані з відновленням  $CO_2$ .

**Фотосинтез прокаріотів.** Мікроорганізми здатні до перетворення світлової енергії. Пурпурові та зелені сірчанобактерії. Ціанобактерії. Особливості будови фотосинтетичного апарату. Аноксигенний фотосинтез (фоторедукція). Функціонування електронтранспортного ланцюга та синтез АТФ у пурпурових сірчанобактерій. Синтез НАЖФ у пурпурових сірчанобактерій. Синтез АТФ та НАДФ у пурпурових несірчаних бактерій та зелених сірчанобактерій. Механізми фіксації  $CO_2$ . Цикл Арнона. Оксигенний фотосинтез. Особливості світлової та темної стадій у ціанобактерій.

### Змістовий модуль 4. Продукти фотосинтезу та їхнє використання. Регуляція фотосинтезу

**Первинні продукти фотосинтезу** – три групи речовин: вуглеводи, амінокислоти, органічні кислоти. Їхній синтез та перетворення у рослин.

**Транспорт продуктів фотосинтезу.** Вихід з хлоропластів у цитоплазму макроергів та відновних еквівалентів. Механізми виходу. Транспорт продуктів асиміляції  $CO_2$  в цитоплазму. Відтік асимілятів з листків у інші органи рослини.

**Регуляція фотосинтезу.** Різні рівні регуляції. Механізми регуляції на рівні мембран тилакоїдів, хлоропластів, клітин, листка та цілої рослини.

**Еволюція фотосинтезу.** Поява фототрофної функції у первинних організмів. Її розвиток від фотогетеротрофів до фотосинтетиків. Еволюція окремих компонентів фотосинтетичного апарату: пігментів, ЕТЛ, асиміляції  $CO_2$ .

# 1. ПРИНЦИПИ МЕТОДІВ

## ФОТОМЕТРІЯ

Метод фотометрії застосовується для визначення концентрації розчинів речовин за поглинанням променів у різних ділянках спектру від інфрачервоного до ультрафіолетового. Одним з найбільш простих методів фотометричного аналізу є колориметрія, яка заснована на вимірюванні поглинання світла забарвленими розчинами у видимій частині спектру.

Розчини багатьох речовин, в тому числі і пігментів рослин, мають характерне забарвлення, яке обумовлене вибіркоvim поглинанням світла іонами та молекулами. Інколи забарвлення проявляється вже після розчинення речовин у воді або іншому розчиннику. Однак найчастіше забарвлення викликають, додаючи до розчину реактив, який взаємодіє з речовиною, що потрібно визначити, і утворює забарвлений розчин. Вимірюючи поглинання світла забарвленим розчином або порівнюючи отримане забарвлення з забарвленням розчину з відомою концентрацією, визначають вміст забарвленої речовини у розчині, що аналізують.

Залежність між інтенсивністю забарвлення розчину і вмістом в ньому забарвленої речовини описується законом Бугера–Ламберта–Бера і виражається рівнянням:

$$I = I_0 \cdot 10^{\varepsilon \cdot C \cdot l},$$

де  $I$  – інтенсивність потоку світла, яке пройшло через розчин;

$I_0$  – інтенсивність потоку світла, що падає на розчин;

$\varepsilon$  – коефіцієнт поглинання світла – постійна величина, яка залежить від природи розчиненої речовини (молярний коефіцієнт поглинання);

$C$  – молярна концентрація забарвленої речовини;

$l$  – товщина шару розчину, який поглинає світло, см.

Величину  $\varepsilon$  (*молярний коефіцієнт поглинання світла*) можна визначити, якщо провести вимірювання поглинання світла 1 М розчину речовини в кюветі з оптичним шляхом 1 см. Вимірювання проводиться за довжини хвилі, яка відповідає максимуму поглинання.

Фізичний сенс закону Бугера–Ламберта–Бера полягає в тому, що розчини однієї і тієї ж забарвленої речовини за однакової її концентрації і товщини шару, і якщо зберігаються інші рівні умови, поглинають одну і ту ж саму частку світла, яке потрапляє на них. Тобто поглинання світла цими розчинами однакове.

Якщо провести логарифмування наведеного рівняння та змінити знаки на обернені, то воно приймає наступний вигляд:

$$\lg(I_0/I) = \varepsilon \cdot C \cdot l.$$

Величина  $lg(I_0/I)$  є найважливішою характеристикою забарвленого розчину і називається *оптичною густиною розчину (D)*:

$$D = (I_0/I) = \varepsilon \cdot C \cdot l.$$

Звідси витікає, що оптична густина прямо пропорційна концентрації забарвленої речовини та товщині її шару.

Відношення інтенсивності монохроматичного потоку випромінювання, який пройшов через дослідний об'єкт, до інтенсивності початкового потоку випромінювання називають *прозорістю* або *пропусканням (T)* розчину:

$$T = \frac{I}{I_0} 10^{-\varepsilon \cdot C \cdot l}.$$

Між оптичною густиною  $D$  та пропусканням  $T$  існує наступне відношення:

$$D = -lgT,$$

або, якщо  $T$  виражають у відсотках:

$$D = \left(\frac{1}{T}\right) \cdot 100 = 2 - lgT.$$

Для визначення концентрації  $C_{досл}$  забарвленого розчину потрібно провести вимірювання його оптичної густини  $D_{досл}$  за допомогою фотоелектроколориметру або спектрофотометру. Крім того, потрібно визначити оптичну густину ( $D_{ст}$ ) стандартного розчину з відомою концентрацією ( $C_{ст}$ ). Товщина шару розчинів в обох випадках повинна бути однаковою. Концентрацію дослідного розчину обчислюють за формулою:

$$C_{досл} = C_{ст} \frac{D_{досл}}{D_{ст}}.$$

Для визначення показників оптичної густини або пропускання використовують електричні прилади типу фотоелектроколориметрів (КФК-2, КФК-2МП, КФЛ-3 тощо) або спектрофотометрів (СФ-26, СФ-47, РД-303, ULAB тощо).

#### **Правила роботи з фотоелектроколориметром КФК-2.**

Фотоелектроколориметр КФК-2 (колориметр фотоелектричний концентраційний) належить до однопроменевих приладів, призначених для вимірювання оптичної густини та пропускання світла за фіксованих довжин хвиль в межах від 315 до 980 нм. Монохроматичні світлові потоки утворюються за допомогою набору світлофільтрів з





визначеними максимумами пропускання світла. Спрощена оптична схема приладу наведена на Рис. 1.

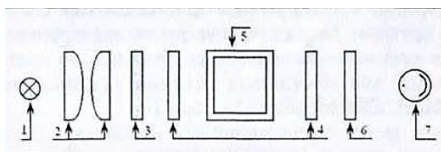


Рис. 1 – Оптична схема  
КФК-2

Як джерело світлового потоку в приладі використовується галогенна лампа (1). Промені світла проходять через конденсор (2) для створення паралельного потоку, один з одинадцяти світлофільтрів (3), за допомогою яких створюється монохроматичний потік світла, і захисне скло (4). Далі промені світла

потрапляють у кювету з дослідним або контрольним розчином (5), де відбувається поглинання світла, і потрапляють на фотоелемент (7), електричний сигнал з якого через електронну схему індикується мікроамперметром. Шкала мікроамперметра має поділки для відліку пропускання світла у відсотках (від 5 до 100 %, верхня шкала) та оптичної густини (від 0 до 1,3, нижня шкала).

Для проведення вимірів потрібно мати дослідний розчин, контрольний розчин (чистий розчинник або суміш реактивів без дослідної речовини) та стандартний розчин для калібрування приладу. Порядок роботи з приладом наступний:

1. Вмикають прилад в мережу струму за допомогою кнопки «Мережа» і дають йому прогрітися протягом 30 хв (**під час прогрівання приладу кришка кюветної камери повинна бути відкритою**).
2. Встановлюють у світловий потік світлофільтр з необхідною довжиною хвилі (ручка з правого боку панелі приладу) та чутливість схеми (ліва ручка з правого боку панелі). (**Увага! Значення довжин хвиль від 315 до 540 нм на шкалі мають чорний колір, а від 590 до 980 нм – червоний. На шкалі чутливості ліва частина позначена цифрами 1, 2 та 3 чорного кольору, а права частина має ті ж самі значення червоного кольору. Якщо використовуються короткохвильові світлофільтри з чорним маркуванням, то на шкалі чутливості перемикач також встановлюється на одне із значень чорного кольору, і навпаки**). Значення чутливості спочатку встановлюють в положення «1».
3. Перемикач кювет (внизу в центрі панелі) переводять у положення «1».
4. У тримач кювет вставляють кювети з контрольним розчином (так, щоб потік світла проходив через неї в положенні «1» перемикача) та дослідним розчином.
5. За контрольним розчином настраюють прилад на 100 % пропускання або 0 оптичної густини за допомогою ручок настройки з правого боку панелі. Якщо стрілка вимірювача не доходить до поділки «100» (шкала пропускання) або «0» (шкала оптичної густини), перемикач чутливості переводять в положення «2» або «3».

6. Переводять перемикач кювет в положення «2» і проводять відлік пропускання оптичної густини.
7. Дослідний розчин у другій кюветі замінюють стандартним і повторюють вимірювання оптичної густини або пропускання світла.

**Правила роботи на спектрофотометрі СФ-26.**

Спектрофотометр СФ-26 призначений для вимірювання коефіцієнту пропускання дослідного зразку ( $T$ ) в ультрафіолетовій та видимій частинах спектру. Світловий потік створюється лампою розжарювання у видимій частині спектру або дейтерієвою лампою в ультрафіолетовій частині. Монохроматичний світловий потік створюється за допомогою тригранної призми, яка розкладає біле світло на спектр. Введення певних променів в кюветну камеру здійснюється поворотом призми та регулюванням ширини щілини, через яку проходить світло (чим менша щілина, тим точніше виділяється монохроматична частина світла). В монохроматичний потік випромінювання по чергово вводяться контрольний та дослідний зразки.



**Послідовність роботи на спектрофотометрі наступна:**

1. Встановити у робоче положення фотоелемент та джерело світла, які відповідають обраному спектральному діапазону вимірювання.
2. Закрити фотоелемент (ручка шторки в положенні «Закр.»).
3. Увімкнути тумблер «Мережа», після чого повинні загорітися лампа «Мережа» та одна з ламп «Д» (дейтерієва) або «Н» (розжарювання) відповідно до обраного джерела світла.
4. Прогріти прилад протягом 1 год.
5. Встановити ручку «КОМПЕНСАЦІЯ» в положення «0».
6. Встановити потрібну довжину хвилі за допомогою барабану, який знаходиться над тумблером, в сторону збільшення довжини хвилі. Якщо за цього шкала повернеться на більший кут, ніж потрібно, то барабан повертається назад на декілька поділок, і знову підводиться до потрібного значення.
7. Встановити ручку «Чутливість» в положення «1» (робоче положення).
8. Встановити у тримач кювет кювети з контрольним та дослідними розчинами.
9. У світловий потік ввести контрольну кювету і за допомогою ручки «Щілина» підвести стрілку гальванометра на «0» поглинання або «100» пропускання.
10. Ввести у світловий потік дослідну кювету і провести відлік оптичної густини або пропускання світла розчину.

**Увага! Під час прогріву приладу, зміни кювет, настройки довжини хвилі та темпового «0» перемикач шторки фотоелементів повинен знаходитися у положенні «Закр.», а під час вимірів – у положенні «Відкр.».**

**Правила роботи на спектрофотометрі Granit 722.** Спектрофотометр моделі 722 складається з шести частин.



1. **Джерело світла:** вольфрамова галогенна лампа, яка випромінює світло в діапазоні довжини хвиль 330–1000 нм.

2. **Монохроматор:** виділяє випромінювання необхідної довжини хвилі та прибирає зайві хвилі.

3. **Кюветна камера:** для розміщення кювет зі стандартними та дослідними розчинами.

4. **Детектор:** перетворює світло, що пройшло через дослідний розчин, у електричний струм.

5. **Мікропроцесор:** перетворює електричний сигнал в цифрову форму.

6. **Дисплей:** відображає отримані дані в одиницях поглинання, пропускання або концентрації.



Рис. 2 – Блок-схема спектрофотометра 722

Світло від лампи фокусується на входній щілині та потрапляє у монохроматор, де призма розкладає його в спектр. Світло обраної довжини хвилі фокусується на вихідну

щілину монохроматора коліміруючим дзеркалом. Далі через один з фільтрів, які дають змогу прибрати паразитне випромінювання другого порядку, промінь проходить через кюветну камеру та потрапляє на детектор – кремнієвий фотодіод. Електричний сигнал, який генерується ним, обробляється мікропроцесором і результат відображається на рідкокристалічному дисплеї у цифровій формі.

**Органи управління та контролю.** Основні органи управління та контролю спектрофотометра моделі 722 показані на Рис 2. Мережевий вимикач розташований на задній стінці приладу.

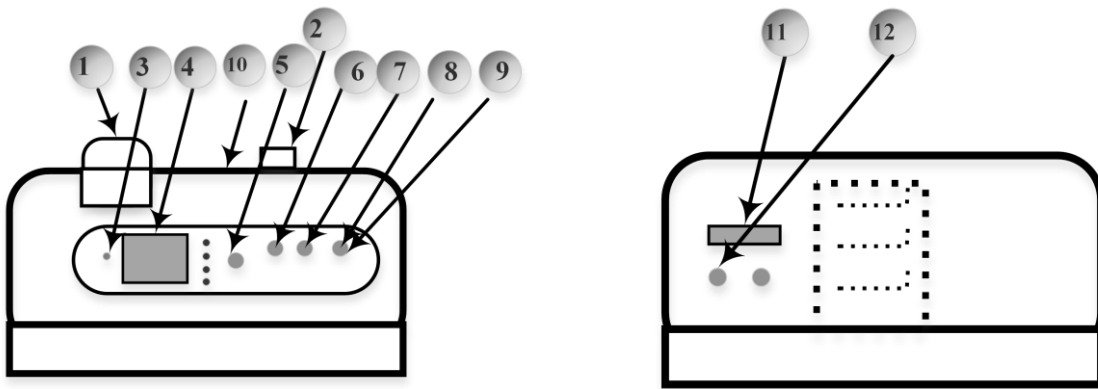


Рис. 3 – Основні органи управління та контролю приладу

1. **Кюветне відділення.** В кюветотримач встановлюються кювети з калібрувальними та дослідними розчинами.
2. **Ручка установки довжини хвилі.** Використовується для установки потрібної довжини хвилі.
3. Індикатор включення приладу(ON/OFF)
4. **Рідкокристалічний дисплей.** Відображає результати вимірів у одиницях поглинання або пропускання, значення концентрації та фактора.
5. **Чотири червоних світлодіоди статусу** справа від цифрового індикатора вказують, який з режимів – вимір оптичної густини, коефіцієнта пропускання, значення фактору або концентрації – активний у поточний момент.
6. **Кнопка вибору режимів роботи.** Дозволяє вибрати режим виміру оптичної густини або коефіцієнта пропускання, установки значення концентрації або фактору.
7. **Кнопка «100».** Використовується для установки 0 од. оптичної густини або 100 % пропускання під час калібрування. Прилад необхідно знову калібрувати після кожної зміни довжини хвилі.
8. **Кнопка «0».** Призначена для установки «0» приладу в режимі пропускання. Установку «0» проводять після кожної зміни довжини хвилі.
9. **Кнопка «PRINT».** Призначена для передачі результатів на принтер або комп'ютер через RS-232 порт.
10. **Кнопка «КОНЦЕНТРАЦІЯ/ФАКТОР».** Використовується у режимі «Концентрація» для установки на дисплеї значення концентрації або відомого фактору.
11. **Вікно для зчитування ДОВЖИНИ ХВИЛІ.** Відображає встановлену довжину хвилі. Ціна найменшого ділення 2 нм.
12. **Роз'єм RS-232 C інтерфейсу.** Розташований на задній стінці приладу.
13. **Аналоговий вихід.** Роз'єм з двома гніздами на задній стінці приладу.

## Робота на приладі.

### Визначення оптичної густини та коефіцієнту пропускання

1. Підключити прилад до мережі. Включити прилад та прогріти не менше 15 хв.
2. Обертанням ручки вибору довжини хвилі встановити необхідну. Установку довжини хвилі необхідно виконувати підводкою з боку коротких довжин хвиль до більш довгих. Якщо під час установки значення довжини хвилі пропущене, необхідно знову повернутися на 20–30 нм до більш коротких та повторно підвести до необхідного значення.
3. Встановити прилад у режим пропускання за допомогою кнопки «**MODE**». Поставити у кюветну камеру непрозору кювету (чорний кубик), закрити кришку кюветної камери та натиснути кнопку «**0**». На дисплеї повинно з'явитися значення  $0.00 \pm 0.01$ . Повторно натиснути кнопку «**0**», якщо значення відрізняється від вказаного. Забрати непрозору кювету.
4. За допомогою кнопки «**MODE**» вибрати режим поглинання (**A**, од. опт. густини або пропускання (**T**, %)).
5. Заповнити кювету водою або розчином для холостої проби, згідно з обраною методикою.
6. Помістити кювету в кюветний відсік та натиснути кнопку «**100**». На дисплеї повинно висвітитися значення  $0.00 \pm 0.01$  (режим виміру оптичної густини).
7. Помістити у кюветний відсік кювету з досліджуваним розчином. Зчитати з дисплея результат в одиницях оптичної густини або процентах коефіцієнта пропускання (відповідно до обраного режиму).
8. Витягти кювету з кюветотримача.
9. Провести подальші виміри відповідно до **8, 9**.
10. За отриманими результатами вимірів провести обчислення згідно з обраною методикою.

### Визначення концентрації.

#### Використання режиму «С/Стандарт»

1. Встановити прилад у режим пропускання за допомогою кнопки «**MODE**». Поставити у кюветний відсік непрозору кювету (чорний кубик), закрити кришку кюветного відсіку та натиснути кнопку «**0**». На дисплеї повинно з'явитися значення  $0.00 \pm 0.01$ . Повторно натиснути кнопку «**0**», якщо значення відрізняється від вказаного. Прибрати непрозору кювету.
2. Натискаючи кнопку «**MODE**» встановити режим оптичної густини (повинен загорітися червоний світлодіод навпроти «**A**»).
3. Помістити кювету з холостою пробєю в кюветотримач і закрити кришку кюветного відсіку.

4. Натиснути кнопку «**100**» (100 % T/0 A). На дисплеї повинно з'явитися **0.00±0.01**.
5. Прибрати холосту пробу з кюветного відсіку.
6. Поставити кювету зі стандартним розчином.
7. Натискаючи кнопку «**MODE**», вибрати режим виміру концентрації (повинен загорітися червоний світлодіод навпроти «**C**»).
8. Використовуючи кнопки «**INC**» та «**DEC**», встановити на дисплеї значення концентрації стандарту та натиснути на кнопку «**ENT**».
9. Витягти кювету зі стандартним розчином.
10. Вставити кювету з досліджуваним розчином, закрити кришку кюветного відсіку та зчитати з дисплея результат в одиницях концентрації.

### **Використання режиму «C/Фактор»**

1. Встановити прилад у режим пропускання за допомогою кнопки «**MODE**». Вставити в кюветний відсік непрозору кювету, закрити кришку кюветного відсіку та натиснути кнопку «**0**». На дисплеї повинно з'явитися значення **0.00±0.01**. Повторно натиснути кнопку «**0**», якщо значення відрізняється від вказаного. Прибрати непрозору кювету.
2. Натискаючи кнопку «**MODE**», встановити режим оптичної густини (повинен загорітися червоний світлодіод навпроти «**A**»).
3. Помістити кювету з холостою пробєю у кюветотримач, закрити кришку кюветного відсіку.
4. Натиснути кнопку «**100**» (100 % T/0 A). На дисплеї повинно з'явитися **0.00±0.01**.
5. Прибрати холосту пробу з кюветного відсіку.
6. Поставити кювету зі стандартним розчином.
7. Натискаючи кнопку, вибрати режим фактору (повинен загорітися червоний світлодіод навпроти «**F**»).
8. Використовуючи кнопки «**INC**» та «**DEC**», встановити на дисплеї значення фактора (0–1999) та натиснути на кнопку «**ENT**».
9. Поставити кювет з досліджуваним розчином, закрити кришку кюветного відсіку та зчитати з дисплея результат у одиницях концентрації.

## **ХРОМАТОГРАФІЯ**

Метод хроматографічного аналізу запропонував російський вчений М. С. Цвет в 1903 р. Він екстрагував петролейним ефіром пігменти з зеленого листа і пропускав розчин через скляну трубку з карбонатом кальцію. Під час проходження розчину через сорбент окремі пігменти розділялися та утворювали ряд кілець, тобто хроматограму. В сучасних дослідженнях, в тому числі і біологічних, хроматографія широко засто-

совується для розділення різних речовин (пігменти, цукри, білки, амінокислоти тощо).

Хроматографічні методи класифікуються за загальними ознаками: за агрегатним станом середовища суміші компонентів, що розділяються; за механізмом процесу розділення; за формою (технікою) проведення хроматографічного процесу.

За агрегатним станом середовища розрізняють *газову, рідинну та газорідинну хроматографію*.

За механізмом процесу розділення сумішей виділяють *адсорбційну, іонообмінну, осадову, розподільну, окислювально-відновну та адсорбційно-комплексуючу хроматографію*.

За технікою проведення розрізняють *колоночну, капілярну та площинну* (хроматографія в тонкому шарі, мембранна та хроматографія на папері).

Найчастіше використовується *розподільна хроматографія*, яка заснована на різному розподіленні речовин між двома рідинами, які не змішуються між собою. При цьому носій (колонка, папір чи тонкий шар) утримує лише одну з рідин, яка є *нерухомим розчинником*. Друга рідина відіграє роль *рухомого розчинника*, який рухається по носію з невеликою швидкістю. Носіями в розподільній хроматографії виступають силікагель, кремнезем, оксид алюмінію, крохмаль, хроматографічний папір; в якості нерухомих розчинників використовують воду, етиловий спирт та деякі інші полярні рідини, а в якості рухомих розчинників – неполярні або малополярні рідини (пентанол, бутанол, ацетон та подібні до них).

Найважливішою характеристикою речовин є відношення їхньої концентрації в рухомому розчиннику до концентрації у нерухомому розчиннику (за досягнення стану рівноваги). Цей показник називається *коефіцієнтом розподілення*:

$$K = \frac{C_{\text{рух}}}{C_{\text{нерух}}}.$$

Оскільки у компонентів суміші різні коефіцієнти розподілення, їхня швидкість руху у носії також різна. Найбільшу швидкість мають компоненти з більшим коефіцієнтом розподілення, тому на хроматограмі вони пройдуть більшу відстань, ніж ті, що мають менший коефіцієнт розподілення.

Ще одним важливим показником розподілення речовин є *відношення шляху, пройденого речовиною, до шляху, який пройшов розчинник – Rf*. Для його визначення вимірюють відстань від лінії старту до центра плями речовини та від лінії старту до лінії фронту розчинника. Для кожної речовини ця величина є постійною і характеризує положення заданої речовини на хроматограмі

$$Rf = \frac{L_{\text{речовини}}}{L_{\text{розчинника}}}.$$

У біологічних дослідженнях дуже часто використовується різновид розподільної хроматографії – **хроматографія на папері**. Носієм нерухомого розчинника в цьому випадку є спеціально оброблений хроматографічний папір. Він являє собою очищений фільтрувальний папір з орієнтованими певним чином волокнами целюлози. Використовують **низхідну** хроматографію, коли розчинник рухається зверху вниз по аркушу паперу, та **висхідну** (розчинник рухається знизу вгору) хроматографію.

Використання хроматографії дозволяє розділяти досить складні суміші речовин і визначати окремо вміст кожної з них. Разом з тим слід враховувати, що якість розділення речовин залежить від багатьох факторів. Найголовнішими з них є концентрації речовин, що розділяються, та температура. Крім того, на розділення впливають якість та структура паперу, насиченість хроматографічних камер парами розчинника.

**Концентрація речовин.** Виходячи з визначення коефіцієнту розподілення, можна зробити висновок, що адсорбція залежить від концентрації речовини в суміші. За низьких концентрацій речовин в розчині значення  $K$  високе, і розділення іде якісно. Якщо концентрації речовин збільшуються, значення коефіцієнту розподілу зменшується, а якщо концентрація речовини на одиницю поверхні сорбенту досягне граничних значень, тривкість зв'язку речовини з сорбентом знижується, і досліджувана речовина «повзе» з потоком розчинника. Але слід враховувати, що за низьких концентрацій речовин, хоча якість розділення буде висока, їх може бути недостатньо для кількісного визначення, тому визначення концентрації речовин для нанесення на хроматограму є дуже складним завданням. Потрібно обрати компромісну кількість речовини на одиницю поверхні хроматограми, яка забезпечила б якісне розділення та необхідну кількість для кількісного аналізу.

**Температура.** Адсорбція є процесом екзотермічним, зворотній процес – десорбція – іде з поглинанням тепла. Звідси витікає, що за зниження температури адсорбційна рівновага зсувається у бік адсорбції, а кількість адсорбованої речовини збільшується. За підвищення температури адсорбція речовин на носії зменшується, тому хроматографічне розділення речовин краще вести за понижених температур. Оптимальною є температура 10–15°C. Для цього хроматографічну камеру приміщують в кювету з льодом. За цих умов зони речовин будуть більш компактними, а їхні границі – більш чіткими.

**Хроматографічний папір.** На якість і швидкість розподілення впливає хроматографічний папір. Хроматографічний папір випускають декількох типів залежно від швидкості руху розчинника: «Швидкий» («Б»), «Середній» («С») та «Повільний» («М»), Для багатьох біологічних досліджень рекомендують використовувати папір марки «Швидкий». В деяких випад-



ках (напр., розділення іонів металів в біологічних об'єктах) хроматографічний папір потрібно додатково очищувати за допомогою обробки певними реактивами і наступним промиванням. Для якісного розділення речовин розчинник треба пропускати вздовж волокон целюлози (звичайно ці волокна розташовують паралельно довгій стороні аркуша).

**Насичення камери парами розчинника** сильно впливає на розділення речовин. Якщо камера недостатньо насичена парами, розчинник швидко випаровується з поверхні хроматограми, і рух його зупиняється (хроматограма висихає). У зв'язку з цим потрібно ретельно закривати камери під час проведення розділення речовин. Інколи, напр., під час розділення цукрів або амінокислот, хроматографічні камери спеціально насичують парами розчинника, наливаючи його на дно камери.

## КОНДУКТОМЕТРИЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ

Кондуктометричний метод аналізу або кондуктометрія базується на зміні електропровідності розчину електроліту. Електропровідність розчину електроліту – це здатність його проводити електричний струм. У розчинах електролітів електричний струм переноситься за рахунок переміщення іонів. Електропровідність – це величина, обернена до опору розчину:

$$W = 1/R .$$

Одиниця виміру електропровідності – Сіменс, См;  $1 \text{ См} = 1 \text{ Ом}^{-1}$ .

**Питома електропровідність.** Опір провідника, згідно із законом Ома, обчислюється за формулою:

$$R = \rho (l/s) ,$$

де  $\rho$  – питомий опір, який дорівнює опору речовини довжиною 1 см при поперечному перерізі  $1 \text{ см}^2$ ;

$l$  – довжина провідника, см;

$s$  – площа поперечного перерізу,  $\text{см}^2$ .

Величина, обернена до питомого опору, називається питомою електропровідністю:

$$k = \frac{1}{R} \qquad k = \frac{1}{R \cdot l/s} ,$$

де  $k$  – питома електропровідність розчину.

Питоною електропровідністю називається електропровідність  $1 \text{ см}^3$  (1 мл) розчину, що міститься між електродами площею  $1 \text{ см}^2$  кожний, відстань між якими дорівнює 1 см.

Питому електропровідність розчину вивчають експериментально. Для цього досліджуваний розчин наливають в спеціальну скляну посудину (кондуктометричну ячейку) із впаєними платиновими пластинками на

відстані  $l$  і площею  $s$ . Відношення  $l/s$  для певної посудини є величиною сталою, яка називається сталою кондуктометричної ячейки. У ячейку наливають розчин електроліту, питома електропровідність якого відома, вимірюють опір  $R$  і обчислюють відношення  $l/s$ . Для цього використовують 0.001, 0.1 і 1.0 н. розчини КСІ, для яких  $k$  за певної температури знаходять в довіднику. Далі вимірюють загальний опір досліджуваного розчину  $R$  у заданій ячейці. За формулою:

$$k = \frac{1}{R \cdot l/s}$$

обчислюють питому електропровідність розчину.

Питома електропровідність чистої речовини залежить від природи електроліту, температури, концентрації іонів у розчині. З підвищенням температури питома електропровідність електроліту збільшується, що пов'язано зі зменшенням в'язкості середовища, внаслідок чого зростає швидкість руху іонів.

За розведення концентрованих розчинів  $k$  спочатку зростає за рахунок послаблення міжіонних електростатичних сил у випадку сильних електролітів і збільшення ступеня іонізації – у випадку слабких електролітів. Подальше розведення призводить до зменшення загальної концентрації іонів у розчині, внаслідок чого електропровідність зменшується.

Складна залежність питомої електропровідності електроліту від концентрації ускладнює обчислення, тому на практиці частіше користуються еквівалентною електропровідністю, яку відносять до 1 екв. розчиненої речовини.

Еквівалентною або мольною електропровідністю називають питому електропровідність, що відноситься до числа еквівалентів  $\eta$  або молів  $\varphi$  в 1 см<sup>3</sup> (мл) розчину:

$$\lambda_v = k \cdot \eta .$$

Оскільки  $\eta = C/1000$ , де  $C$  – загальна концентрація речовини, то залежність між питомою і еквівалентною електропровідністю виражається рівнянням:

$$\lambda_v = (k \cdot 100)/C .$$

Залежність між  $\lambda_v$  і  $k$  можна також виразити рівнянням:

$$\lambda_v = k \cdot v \cdot 1000 ,$$

де  $v$  – розведення розчину – величина, обернена до концентрації розчину, вираженої в л/екв:

$$v = \frac{1}{C}$$

**Розведення** – це об’єм розчину, який містить 1 екв. електроліту.

Еквівалентна електропровідність залежить від концентрації, температури розчину електроліту. З розведенням сильних електролітів  $\lambda_v$  зростає за рахунок зменшення іонної сили розчину. За цього електростатична взаємодія між іонами зменшується, а їхня рухливість збільшується. У слабких електролітів зростання електропровідності з розведенням обумовлено збільшенням ступеня іонізації.

За нескінченно великого розведення вплив іонів один на одного стає непомітним, кожний з іонів рухається незалежно від інших, і еквівалентна електропровідність в такому випадку може бути представлена як сума електропровідності іонів, а еквівалентна електропровідність досягає свого максимального значення.

Та частина еквівалентної електропровідності, яка припадає на один з видів іонів, називається рухливістю іону.

Еквівалентна електропровідність за нескінченно великого розведення розчину дорівнює сумі рухливостей іонів електроліту:

$$\lambda_{\infty} = l_a + l_k,$$

де  $l_a$  – рухливість аніону;

$l_k$  – рухливість катіону.

Ця рівність називається законом незалежності руху іонів (законом Кольрауша). Закон Кольрауша дозволяє на основі табличних даних розрахувати еквівалентну електропровідність електроліту при нескінченно великому розведенні.

Визначивши дослідним шляхом еквівалентну електропровідність електроліту, можна розрахувати ступінь і константу іонізації слабого електроліту:

$$\alpha = \frac{\lambda_v}{\lambda_{\infty}}, \quad K_{\text{іон}} = \frac{(C \cdot \alpha^2)}{(1 - \alpha)}.$$

## ІНФРАЧЕРВОНИЙ ГАЗОАНАЛІЗ

Метод ґрунтується на здатності  $\text{CO}_2$  вибірково поглинати енергію інфрачервоних променів з довжиною хвилі 420–430 нм. Вимірювання інтенсивності поглинання інфрачервоних променів за пропускання дослідних та контрольних зразків повітря через кювети інфрачервоного газоаналізатора дає змогу визначити зміну концентрації  $\text{CO}_2$  у повітрі у процесі фотосинтезу або дихання рослин.

Перевагою методу є можливість безперервної, автоматичної реєстрації змін вмісту  $\text{CO}_2$  в ході дослідів та висока точність визначення.

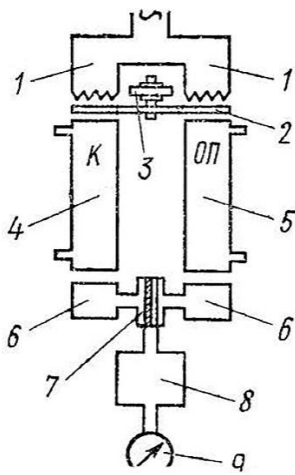


Рис. 4 – Схема інфрачервоного газоаналізатора

Використання інфрачервоного газоаналізатора дає змогу визначити інтенсивність фотосинтезу у польових та лабораторних умовах, не змінюючи природної концентрації  $\text{CO}_2$  у повітрі і без порушення цілісності фотосинтезуючих тканин. Тому в останні роки метод визначення фотосинтезу з використанням інфрачервоного газоаналізу знаходить широке застосування в багатьох лабораторіях.

Найчастіше для визначення концентрації  $\text{CO}_2$  у повітрі використовуються оптико-акустичні газоаналізатори, які складаються з інфрачервоного випромінювання (ніхромові спіралі) (Рис. 4, 1).

Інфрачервоне випромінювання переривається диском (2), який обертається за допомогою мотора (3). Далі промені проходять дві кювети (4, 5). Кювети з обох боків мають отвори, закриті літій-фтористим склом, яке пропускає інфрачервоне випромінювання лише визначених довжин хвиль.

Одна з кювет (4) може бути заповнена азотом, вільним від  $\text{CO}_2$ , і в цьому випадку прилад реєструє абсолютний вміст  $\text{CO}_2$  у повітрі. Замість азоту через цю кювету можна пропустити контрольний зразок повітря, а через інший (5) – дослідний. В цьому випадку прилад діє за диференціальною схемою, реєструючи різницю у вмісті  $\text{CO}_2$  в контрольному повітрі і повітрі, яке пройшло через камеру з листком.

У кюветах залежно від концентрації  $\text{CO}_2$  у потоках повітря поглинається частина енергії інфрачервоного випромінювання. Залишок випромінювання повністю поглинається диоксидом вуглецю, яким заповнені вимірювальні камери (6) поглинача променів. Вимірювальні камери пов'язані з мірчою камерою (7), у якій є мембрана, що поділяє поглинач променів на дві частини. Обертання диска (2) перериває потік інфрачервоних променів, що веде до нагрівання та охолодження газу у камерах поглинач променів. Газ за цих умов змінює свій об'єм. Ці коливання передаються на мембранний конденсатор, який підключено до підсилювача (8). Якщо концентрація  $\text{CO}_2$  у зразках повітря, яке проходить через кювети, однакова в обох камерах, то газ чинить однаковий тиск на мембрану, і вона залишається нерухомою. З мембранного конденсатора знімається нульовий сигнал. У разі різної концентрації  $\text{CO}_2$  у повітрі, яке заповнює кювети (4) та (5), буде мати місце різне поглинання інфрачервоного випромінювання в кюветах та вимірювальних камерах, неоднакове нагрівання і тиск  $\text{CO}_2$  у камерах поглинач променів. Мембрана відхиляється у бік камери з меншим тиском. З мембранного конденсатора знімається сигнал, пропорційний різниці вмісту  $\text{CO}_2$  в кюветах, який передається у підсилювач (8) і далі на реєстраційний пристрій (9).

## 2. АНАЛІЗ ПІГМЕНТНОГО КОМПЛЕКСУ РОСЛИН

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2.1. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЗЕЛЕНИХ ПІГМЕНТІВ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

Зелені пігменти – хлорофіли – мають велике значення в процесі фотосинтезу, оскільки є первинними акцепторами сонячної енергії. Від їхньої кількості значною мірою залежить інтенсивність фотосинтезу.

Кількість зелених пігментів може бути визначена за допомогою вимірювання оптичного поглинання при певній довжині хвилі світла. Інтенсивність поглинання світла (оптична густина) залежить від концентрації пігментів в розчині і може бути встановлена за допомогою спектрофотометру. Слід враховувати, що максимум поглинання залежить не тільки від природи пігменту, але і від розчинника, який використовується для екстракції пігментів.

**Хід роботи.** Беруть наважку (0,025–0,1 г) свіжого рослинного матеріалу і ретельно розтирають її у фарфоровій ступці з невеликою кількістю розчинника (2–3 мл) та крейди ( $\text{CaCO}_3$ ) або вуглекислого магнію ( $\text{MgCO}_3$ ). Ступку закривають кришкою чашки Петрі зі скла, або пластинку і вміст настоюють протягом 2–3 хв. Гомогенат переносять на скляний фільтр Шотта № 3 або № 4 (діаметр пор 40 або 16 мкм), який вставляють в колбу Бунзена, з'єднану з вакуумним насосом, і фільтрують. Екстракцію повторюють декілька разів до повного знебарвлення рослинного матеріалу.

Фільтрат кількісно переносять у мірну пробірку і об'єм фільтрату доводять до 10 мл розчинником. Отримана витяжка містить суміш зелених та жовтих пігментів. Далі визначають оптичну густину розчину пігментів, встановлюючи довжини хвиль залежно від використаного розчинника (табл. 2.1).

**Таблиця 2.1** Значення довжин хвиль для вимірювання вмісту пігментів та формули розрахунку концентрацій залежно від використаного для екстракції пігментів розчинника

Розчинник	Пігмент	Довжина хвилі, нм	Формула розрахунку концентрації, мг/л
Ацетон – 100 % (Хольм-Вегштейн)	Хлорофіл а	662	$C_{chl a} = 9.784 \cdot D_{662} - 0.990 \cdot D_{644}$
	Хлорофіл б	644	$C_{chl b} = 21.426 \cdot D_{644} - 4.650 \cdot D_{662}$
	Сума		$C_{chl a+b} = 5.134 \cdot D_{662} + 20.436 \cdot D_{644}$
Ацетон – 100 % (Шлик)	Каротиноїди	440.5	$C_{kar} = 4.695 \cdot D_{440.5} - 0.268 \cdot (C_{chla} + C_{chlb})$
	Хлорофіл а	662	$C_{chl a} = 11.70 \cdot D_{662} - 2.09 \cdot D_{644}$
	Хлорофіл б	644	$C_{chl b} = 21.19 \cdot D_{644} - 4.56 \cdot D_{662}$
	Сума		$C_{chl a+b} = 7.14 \cdot D_{662} + 19.10 \cdot D_{644}$

Розчинник	Пігмент	Довжина хвилі, нм	Формула розрахунку концентрації, мг/л
Ацетон – 80 % (Вернон)	Хлорофіл а	665	$C_{chl a} = 11.63 \cdot D_{665} - 2.39 \cdot D_{649}$
	Хлорофіл b	649	$C_{chl b} = 20.11 \cdot D_{649} - 5.18 \cdot D_{665}$
	Сума		$C_{chl a+b} = 6.45 \cdot D_{665} + 17.72 \cdot D_{649}$
Ацетон – 80 % (Ліхтента лер)	Хлорофіл а	663	$C_{chl a} = 12.21 \cdot D_{663} - 2.81 \cdot D_{646}$
	Хлорофіл b	646	$C_{chl b} = 20.13 \cdot D_{646} - 5.03 \cdot D_{663}$
	Каротиноїди	479	$C_{kar} = \frac{1000 \cdot D_{479} - 3.27 \cdot C_{chla} - 100 \cdot C_{chlb}}{229}$
Етанол – 96 % (Вінтерманс де Мотс)	Хлорофіл а	665	$C_{chl a} = 13.70 \cdot D_{665} - 5.76 \cdot D_{649}$
	Хлорофіл b	649	$C_{chl b} = 25.80 \cdot D_{649} - 7.60 \cdot D_{665}$
Етиловий ефір	Хлорофіл а*	660	$C_{chl a} = 9.93 \cdot D_{660} - 0.77 \cdot D_{642.5}$ або $C_{chl a} = 12.3 \cdot D_{660} - 3.2 \cdot D_{642} - 67.5 \cdot D_{535}$
	Хлорофіл b*	642.5 642	$C_{chl b} = 17.6 \cdot D_{642.5} - 2.81 \cdot D_{660}$ або $C_{chl a} = 18.8 \cdot D_{642} - 1.51 \cdot D_{660} - 26.8 \cdot D_{535}$
	Сума		$C_{chl a+b} = 7.12 \cdot D_{660} + 16.8 \cdot D_{642.5}$
	Каротиноїди	480	$C_{kar} = \frac{1000 \cdot D_{480} - 0.52 \cdot C_{chla} - 16.8 \cdot C_{chlb}}{226}$
	Феофітин	535	$C_{C=Феофит} = 109 \cdot D_{535} - 6.7 \cdot D_{642} - 3.4 \cdot D_{660}$

\* – у нижньому рядку наведена формула для обчислення концентрацій у присутності феофітину.

Вміст хлорофілів в рослинному матеріалі обчислюють за формулою:

$$A = \frac{C \cdot V}{n \cdot 1000},$$

де  $A$  – вміст пігментів в рослинній тканині, мг/г сирової ваги;

$C$  – концентрація пігментів у витяжці, мг/л;

$V$  – об'єм витяжки пігментів, мл;

$n$  – наважка рослинного матеріалу, г.

**Обладнання:** 1) дослідні рослини; 2) фарфорові ступки з товчачиками; 3) терези з гирками; 4) фільтр Шотга № 3 або № 4; 5) колба Бунзена; 6) вакуумний насос; 7) мірні пробірки об'ємом 10 або 20 мл; 8) піпетки на 1,5 та 10 мл; 9) мірні циліндри об'ємом 50 та 100 мл; 10) конічні колби об'ємом 100 мл; 11) спектрофотометр; 12) ножиці.

**Реактиви:** 1) ацетон або інший розчинник; 2) вуглекислий кальцій (крейда) або вуглекислий магній; 3) лід.

### Контрольні питання

1. Яких умов потрібно дотримуватися при екстракції пігментів?

2. Дайте характеристику полярних та неполярних розчинників.
3. Для чого при екстракції пігментів додають вуглекислий кальцій або магній?
4. Який принцип покладено в основу визначення вмісту хлорофілу *a* та хлорофілу *b* в сумарній витяжці пігментів?
5. Чи можна в сумарній витяжці пігментів визначити вміст каротиноїдів?
6. Наведіть методику роботи на спектрофотометрі.
7. Що характеризує молярний коефіцієнт поглинання?
8. Які показники необхідно знати для обчислення вмісту хлорофілів в сирому рослинному матеріалі?
9. У яких межах знаходяться кількісні показники вмісту хлорофілів у рослинах?
10. У яких числових межах знаходиться відношення хлорофілів *a* та *b* в рослинах?

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2.2. РОЗДІЛЕННЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПІГМЕНТІВ РОСЛИН МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФІЇ НА ПАПЕРІ (ЗА Д. І. САПОЖНИКОВИМ)**

**Приготування екстракту пігментів.** Усі роботи з хроматографічного розділення пігментів проводяться в затемненому приміщенні, а екстракція пігментів – за охолодження. Для стабілізації пігментів приготування екстракту ведуть у лужному середовищі.

Беруть наважку 0,5 г свіжого рослинного матеріалу і ретельно розтирають в охолодженій льодом фарфоровій ступці з безводним сульфатом натрію ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , близько 1 г на кожні 0,5 г наважки) та невеликою кількістю крейди ( $\text{CaCO}_3$ ). Далі в ступку додають 3–5 мл охолодженого етилового спирту, ацетону або їхньої суміші у співвідношенні 1:3, і настоюють протягом 5 хв. Для попередження випаровування екстракційної суміші ступку накривають склом або кришкою чашки Петрі. Далі гомогенат переносять на скляний фільтр Шотта № 3 (діаметр пор 40 мкм), з'єднаний з колбою Бунзена, та фільтрують розчин пігментів. Осад на фільтрі декілька разів промивають невеликими порціями (2–3 мл) екстракційної суміші і доводять об'єм екстракту до 10 мл. Отриманий екстракт містить суміш каротиноїдів та хлорофілів. Для розділення суміші проводять хроматографію.

**Нанесення пігментів на хроматограму.** Для хроматографії використовується хроматографічний папір або тонкошарові пластинки. За проведення хроматографії на папері вирізають прямокутник розміром 16×12 см. Волокна паперу повинні розташовуватися вздовж короткого боку паперу. Відступають по 2 см від нижнього та бокових країв аркушу паперу та простим олівцем наносять лінію (**Увага!** Всі позначки та написи на хрома-

тограмах роблять тільки простим нехімічним олівцем). На накреслену лінію за допомогою піпетки обережно наносять 0,5 або 1 мл прозорої витяжки пігменту. Наносити потрібно поступово, не даючи витяжці розтікатися. **Ширина смуги не повинна перевищувати 5 мл. Вона повинна бути рівною та однаковою за шириною за усією довжиною смуги.** Якщо цього правила не дотримуватися, можливе вимивання пігментів у розчинник та отримання неякісної хроматограми.

На тонкошарову пластинку витяжка наноситься так само, як і на папір. Слід враховувати, що пластинки випускаються квадратні (16×16 см) і не мають певного напрямку.

Після нанесення витяжки пігментів на хроматограму її просушують в потоці повітря і приміщують у хроматографічну камеру для розділення пігментів. Хроматографічна камера являє собою циліндричну посудину висотою 17–18 см з внутрішнім діаметром близько 9 см з кришкою. Можна використовувати хімічний стакан з задовільними розмірами, а в якості кришки використовувати кришку чашки Петрі.

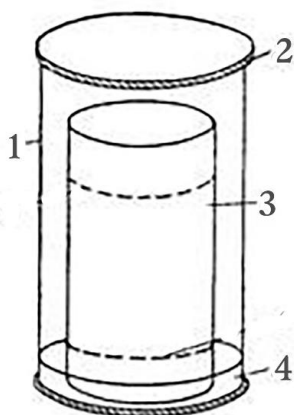


Рис. 5 – Хроматографічна камера  
1 – камера, 2 – кришка,  
3 – хроматограма,  
4 – розчинник

Розділення виконують на хроматографічному папері або силуфолових пластинках розміром 15×15 см.

Пігменти нанести капіляром по всій ширині пластинки, відступаючи на 2 см від її нижнього краю та на 1 см від бічних країв. Об'єм нанесеного екстракту – 0,5–0,8 мл (Рис. 5).

Хроматографічний папір або пластинку ретельно підсушити у струмені повітря, помістити у хроматографічну камеру, попередньо насичену сумішшю розчинників (**бензин, ацетон, петролейний ефір, гексан в об'ємних співвідношеннях 10:10:3:10; або бензин, петролейний ефір, ацетон в об'ємних співвідношеннях 8,5:3,5:3,5**). Залежно від рослинного об'єкта суміш розчинників та їхні об'ємні співвідношення добирається експериментально.

**Розгонку проводять у темряві.**

Після того, як рівень розчинника підніметься майже до верхнього краю пластинки (10–30 хв), хроматограму вийняти та висушити під струменем повітря.

Порядок розташування окремих зон пігментів на хроматограмі наступний: стартова пляма може бути зеленою або рожевою за наявності хлорофілу й антоціанів, хлорофіл *b* – жовто-зеленого кольору, хлорофіл *a* – синьо-зелений, жовті ксантофіли і червоно-жовтий каротин (рухається разом із фронтом розчинника). Крім того, на хроматограмі часом виявляється бурий феофітин (Рис. 6).

Для розділення лише каротиноїдів поставити другу хроматограму в іншу систему розчинників – суміш бензолу і петролейного ефіру (3:1).



Пігменти розподіляються так: знизу – стартова зона, віолаксантин, лютеїн-епоксид, лютеїн, каротин. Між стартовою плямою і жовтими пігментами нерозділеними залишаються хлорофіли.

Для виявлення неоксантину поставити ще одну хроматограму в роздільну суміш етиловий спирт – петролейний ефір (1:20).

Пігменти на хроматограмі розміщуються в такому порядку: зверху – каротин, нижче – хлорофіл *a*, суміш ксантофілів, хлорофіл *b*, неоксантин.

**Визначення концентрації хлорофілів і каротиноїдів.** Забарвлені зони на хроматограмах, що відповідають каротину та ксантофілам (неоксантин, віолаксантин, антероксантин, лютеїн + зеаксантин), зняти скальпелем або вирізати ножицями з 2–3 хроматограм. Зони однойменних пігментів об'єднати і помістити у пробірки з притертими пробками.

Проводять елюцію пігментів такими розчинниками: каротин – петролейним ефіром, ксантофіли – етанолом за постійного струшування. Елюат відфільтрують через скляний фільтр або центрифугують і переносять у мірні пробірки з притертою пробкою, фільтр кілька разів промити відповідним розчинником і довести об'єм до 3 мл.

Оптичну густину вимірюють на спектрофотометрі: каротин – за 452 нм, лютеїн – за 445, віолаксантин – за 442, неоксантин – за 438, хлорофіли *a* і *b* – у сірчаному ефірі за довжини хвилі відповідно 662 та 642 нм.

**Таблиця. 2.2** Питомі коефіцієнти екстинції для основних пігментів фотосинтезу

Пігмент	Максимум поглинання, нм	Розчинник	Питомий коефіцієнт екстинції
<b><math>\alpha</math>-Каротин</b>	464	Хлороформ	<b>220</b>
<b>Каротини</b>	452	Петролейний ефір	<b>260</b>
<b><math>\beta</math>-Каротин</b>	456	Хлороформ або гексан	<b>242</b>
<b>Лютеїн</b>	445	Етанол	<b>258</b>
<b>Віолаксантин</b>	442	- “ -	<b>225</b>
<b>Зеаксантин</b>	451	- “ -	<b>248</b>
<b>Неоксантин</b>	438	- “ -	<b>227</b>
<b>Антераксантин</b>	446	- “ -	<b>235</b>
<b>Хлорофіл <i>a</i></b>	662	Диетиловий ефір	<b>9,81</b>
<b>Хлорофіл <i>b</i></b>	642	- “ -	<b>17,6</b>

Концентрацію пігментів (*C*, г/л) обчислюють за формулою:

$$C = \frac{D}{A \cdot L},$$

де *D* – оптична густина за відповідної довжини хвилі, ум. од.;

*A* – питомий коефіцієнт погашення, л/(г·см);

*L* – товщина шару розчину, см.

Вміст пігментів в 1 г маси сирої речовини ( $A$ , мг/г) обчислюють за формулою:

$$A = \frac{C \cdot V \cdot K}{N},$$

де  $C$  – концентрація пігментів, г/л;

$V$  – об'єм екстракту, мл;

$K$  – відношення об'єму елюату до загального об'єму екстракту, нанесеного на хроматограмі;

$N$  – наважка рослинного матеріалу, г.

**Обладнання:** 1) дослідні рослини; 2) фарфорові ступки з товчачиками; 3) терези з гирками; 4) мірні пробірки об'ємом 10 мл; 5) хроматографічні камери або високі стакани об'ємом 500–600 мл з кришками; 5) фільтр Шотта № 3; 6) колба Бунзена; 7) насос Камовського; 8) пробірки об'ємом 10 мл; 9) піпетки на 1, 5 та 10 мл; 10) мікропіпетки на 0,1 або 0,2 мл; 11) колби об'ємом 100 мл; 12) хроматографічний папір марки «Швидкий»; 13) простий олівець та лінійка; 14) ножиці; 15) хроматографічний столик; 16) вентилятор; 17) спектрофотометр.

**Реактиви:** 1) ацетон; 2) спирт етиловий 96 %; 3) петролейний ефір; 4) етиловий ефір; 5) лід; 6) сульфат натрію; 7) вуглекислий натрій.

### **Контрольні питання**

1. Чому для екстракції пігментів використовують етиловий спирт, ацетон або їхню суміш, а не будь-який інший органічний розчинник (гексан, хлороформ тощо)?
2. Дайте характеристику методу хроматографічного розділення речовин. Які умови впливають на якість розділення?
3. Як проводиться хроматографія пігментів? Що потрібно зробити, щоб відокремити від суміші пігментів неоксантин?
4. Як обчислюється кількість пігментів у рослинному матеріалі?
5. Наведіть характеристики поглинання світла каротиноїдами. За яких довжин хвиль проводиться визначення кількості каротину та ксантофілів?
6. Наведіть характеристики поглинання світла хлорофілів. За яких довжин хвиль проводиться визначення кількості пігментів?
7. Якими числовими значеннями характеризується вміст пігментів в рослинах? Які значення мають співвідношення каротиноїдів між собою (каротину до ксантофілів) та каротиноїдів до хлорофілів?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2.3. ВИВЧЕННЯ СПЕКТРІВ ПОГЛИНАННЯ ЗЕЛЕНИХ ПІГМЕНТІВ

Спектром поглинання називають залежність величини поглинання світлових променів речовиною від їхньої довжини (частоти), яка виражається кривою поглинання. Спектри поглинання характеризуються кількістю та розташуванням максимумів поглинання, інтенсивністю окремих смуг поглинання та їхньою півшириною. Розташування максимумів поглинання найчастіше виражають довжиною хвилі (в нм). Інтенсивність смуги поглинання визначається ймовірністю переходу електрону на вищу орбіталь за поглинання кванту світла певної довжини молекулою речовини. Розташування максимумів поглинання часто використовують для якісного аналізу речовин, тоді як інтенсивність поглинання (оптичну густину) в зоні головного максимуму використовують для кількісного аналізу речовин.

Спектри поглинання речовин можна визначити за допомогою будь-якого спектрофотометра.

**Хід роботи.** Наважка свіжого рослинного матеріалу у кількості 0,5 г подрібнюється за допомогою ножиць і розтирається до гомогенного стану у фарфоровій ступці, охолодженій льодом до гомогенного стану. Для стабілізації пігментів при розтиранні до рослинної тканини додають невелику кількість сульфату натрію ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) та карбонату кальцію (крейди,  $\text{CaCO}_3$ ). Розтерту масу заливають 2–3 мл суміші ацетону та спирту (3:1) і настоюють протягом 4–5 хв. Для попередження випаровування суміші ступку накривають склом або кришкою чашки Петрі. Далі гомогенат обережно переносять на фільтр Шотта № 3 і фільтрують. Осад на фільтрі знову заливають сумішшю ацетону та спирту, перемішують і фільтрують. Екстракцію пігментів ведуть до тих пір, доки фільтрат не стане прозорим. Об'єм екстракту доводять розчинником до 10 або 20 мл і використовують для нанесення на хроматограми.

**Розділення пігментів.** З аркушу хроматографічного паперу марки «Швидкий» вирізають хроматограму висотою 16 см та шириною 8 см. На відстані 2 см від нижнього краю хроматограми проводять простим олівцем лінію старту і наносять на лінію старту суміш пігментів. Витяжку наносять невеликими порціями за допомогою мікропіпеток з таким розрахунком, щоб ширина смуги пігментів не перевищувала 7 мм. Після нанесення кожної порції витяжки хроматограму просушують в потоці повітря. Загальний об'єм нанесеного екстракту на хроматограму повинен дорівнювати 1 мл. Після нанесення останньої порції витяжки хроматограму висушують і приміщують у хроматографічну камеру, до якої попередньо наливають 20–30 мл суміші петролейного ефіру та етилового спирту у співвідношенні 20:1 (добрі результати також дає використання цих реактивів у співвідношенні 14:1). Хроматографічну камеру закривають кришкою і ставлять у темряву. Розділення пігментів ведуть протягом 10–35 хв. Розчинник повинен пройти приблизно  $\frac{3}{4}$  висоти хроматограми, і на папері має бути чітко видно дві

зони зелених пігментів. Жовті пігменти на цій хроматограмі практично не розділяються між собою. Після закінчення хроматографії хроматограму виймають з камери, ретельно просушують в потоці повітря. Далі простим олівцем обводять зони зелених пігментів (верхня – синьо-зелена – хлорофілу *a*, та нижня – жовто-зелена – хлорофілу *b*), вирізають їх і подрібнюють. Подрібнений папір з пігментами (окремо хлорофіл *a* та хлорофіл *b*) приміщують в сухі чисті пробірки для елюації.

**Елюація пігментів та визначення спектру поглинання.** Елюацію пігментів здійснюють сумішшю ацетону та етилового спирту у співвідношенні 3:1, яку наливають в пробірки із подрібненою хроматограмою в кількості 5 мл. Екстракція пігментів з хроматограми проводиться протягом 20 хв за періодичного струшуванні вмісту пробірок.

Після елюації визначають спектри поглинання розчинів хлорофілу *a* та *b* за допомогою спектрофотометра. Для цього вимірюють оптичну густину розчинів в інтервалі від 400 до 700 нм з проміжками, що дорівнюють 5–10 нм. За результатами вимірів будують графік, який характеризує спектр поглинання хлорофілу *a* та хлорофілу *b*. Для цього на вісі абсцис відкладають довжину хвилі, а на вісі ординат – оптичну густину розчинів.

**Обладнання:** 1) дослідні рослини; 2) фарфорові ступки з товчачиками; 3) терези з гирками; 4) мірні пробірки об'ємом 10 мл; 5) хроматографічні камери або високі стакани об'ємом 500–600 мл з кришками; 5) фільтр Шотта № 3; 6) колба Бунзена; 7) вакуумний насос; 8) пробірки об'ємом 10 мл; 9) піпетки на 1, 5 та 10 мл; 10) мікропіпетки на 0,1 або 0,2 мл; 11) колби об'ємом 100 мл; 12) хроматографічний папір марки «Швидкий»; 13) простий олівець та лінійка; 14) ножиці; 15) хроматографічний столик; 16) вентилятор; 17) спектрофотометр.

**Реактиви:** 1) ацетон; 2) спирт етиловий 96 %; 3) петролейний ефір; 4) етиловий ефір; 5) лід; 6) сульфат натрію; 7) вуглекислий кальцій.

### **Контрольні питання**

1. Що таке спектр поглинання речовини? Від чого залежить і для чого використовується?
2. У яких одиницях виражається інтенсивність поглинання світла речовиною?
3. Наведіть методику роботи на спектрофотометрі.
4. Яких умов необхідно дотримуватися під час екстракції пігментів?
5. Дайте характеристику хроматографічному методу розділення зелених пігментів.
6. Наведіть характеристику спектрів поглинання хлорофілів. Чим відрізняються спектри поглинання хлорофілу *a* та хлорофілу *b*? Чим визначається ця різниця?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2.4. ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕКТРІВ ПОГЛИНАННЯ ЖОВТИХ ПІГМЕНТІВ

**Хід роботи.** Наважку листя в кількості 1 г подрібнюють і розтирають в охолодженій льодом фарфоровій ступці до гомогенного стану в присутності невеликої кількості вуглекислого кальцію (крейди) та сульфату натрію. До розтертої маси додають 2–3 мл суміші ацетону та етилового спирту у співвідношенні 3:1 і розтирають ще декілька (2–3) хвилин. Ступку накривають склом або кришкою чашки Петрі і настоюють протягом 3–5 хв. Гомогенат кількісно переносять на скляний фільтр Шотта № 3 і фільтрують у суху чисту пробірку. Залишок тканини заливають 2–3 мл суміші ацетону зі спиртом, настоюють приблизно 30 сек і фільтрують, операцію повторюють до тих пір, доки з фільтру не стане витікати безбарвна екстракційна суміш. Об'єм витяжки пігментів доводять до 10 або 20 мл. Екстракт використовують для нанесення на хроматограму.

**Розділення пігментів.** З аркушу хроматографічного паперу марки «Швидкий» вирізають хроматограму розміром 14×8 см. Відступивши 2 см від нижнього краю та по 1 см з боків, простим олівцем проводять лінію старту, на яку невеликими порціями за допомогою мікропіпетки наносять 1–2 мл екстракту пігментів. Після нанесення кожної порції та наприкінці хроматограму просушують в потоці повітря. Нанесена смуга пігментів повинна бути рівною і її ширина не повинна перевищувати 7–8 мм.

Підготовлену хроматограму приміщують у хроматографічну камеру, в яку попередньо наливають 20–30 мл розчинника – суміші бензолу та петролейного ефіру в співвідношенні 2:1 або 3:1. Камеру накривають кришкою і переміщують у темряву. Розділення ведуть протягом 10–30 хв до повного розділення жовтих пігментів. Пігменти на хроматограмі розташовуються в наступному порядку зверху донизу: *каротин, лютеїн, віолксантин*. Після розділення пігментів хроматограми виймають з камер, смуги пігментів обводять простим олівцем і вирізають. Подрібнені ділянки хроматограм переміщують у чисті сухі пробірки і проводять елюацію пігментів.

**Елюація пігментів та визначення спектрів поглинання.** Для елюації пігментів подрібнені смужки хроматографічного паперу з зонами пігментів в пробірках заливають сумішшю ацетону та етилового спирту (3:1) і настоюють протягом 20 хв, періодично збовтуючи. Отримані розчини пігментів використовують для встановлення спектрів поглинання, для чого вимірюють оптичну густину розчину кожного пігменту на спектрофотометрі в інтервалі від 380 до 550 нм через кожні 5–10 нм. На основі отриманих даних будують графіки, відкладаючи на вісі абсцис значення довжини хвиль, а на вісі ординат – оптичну густину.

**Обладнання:** 1) дослідні рослини; 2) фарфорові ступки з товчачиками; 3) терези з гирками; 4) мірні пробірки об'ємом 10 мл; 5) хроматографічні камери або високі стакани об'ємом 500–600 мл з кришками; 5) фільтр

Шотта № 3; 6) колба Бунзена; 7) вакуумний насос; 8) пробірки об'ємом 10 мл; 9) піпетки на 1, 5 та 10 мл; 10) мікропіпетки на 0,1 або 0,2 мл; 11) колби об'ємом 100 мл; 12) хроматографічний папір марки «Швидкий»; 13) простий олівець та лінійка; 14) ножиці; 15) хроматографічний столик; 16) вентилятор; 17) спектрофотометр.

**Реактиви:** 1) ацетон; 2) спирт етиловий 96 %; 3) бензол; 4) петролейний ефір; 5) етиловий ефір; 6) лід; 7) сульфат натрію; 8) вуглекислий натрій.

### **Контрольні питання**

1. У якій ділянці спектру знаходяться максимуми поглинання світла розчинів каротиноїдів в ацетоні та етиловому спирті?
2. Чим відрізняються за будовою молекули каротинів та ксантофілів? Які відмінності в їхніх спектрах поглинання світла?
3. Охарактеризуйте роботу на спектрофотометрі.
4. Дайте характеристику методу хроматографії на папері.
5. Наведіть характеристику етапів визначення спектрів поглинання жовтих пігментів.
6. Яких умов необхідно дотримуватися під час екстракції та хроматографії пігментів?

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2.5. ВИДІЛЕННЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТОХЛОРОФІЛУ З ВИКОРИСТАННЯМ ПОЛЯРНИХ ТА НЕПОЛЯРНИХ РОЗЧИННИКІВ**

Протохлорофіл (протохлорофілід) є попередником хлорофілу у біосинтетичному ланцюгу. Він утворюється в результаті ферментативних реакцій, які відбуваються в темряві. Перетворення протохлорофілу в хлорофіл пов'язане з гідруванням подвійного зв'язку між 7 та 8 атомами вуглецю в IV пірольному кільці. Ця реакція у більшості зелених рослин відбувається за рахунок сонячної енергії.

Для роботи використовуються рослини, які вирощувалися за нормального освітлення, а також перед визначенням пігментів 24 та 48 год перебували у темряві.

**Хід роботи.** Беруть наважку листя 1–5 г, фіксують у затемненому приміщенні гарячою парою або у воді за температури 95°C протягом 2 хв. Листя висушують фільтрувальним папером, переміщують у ступку, додають невелику кількість 0,1 N NH<sub>4</sub>OH для нейтралізації органічних кислот та інактивації хлорофілази та розтирають з невеликою кількістю піску та 80 % ацетону (4–5 мл). Всі наступні операції проводяться за звичайного освітлення. Розтерту до гомогенного стану масу переносять на скляний фільтр Шотта № 3 і фільтрують. Залишок на фільтрі знову заливають

4–5 мл 80 % ацетону, перемішують скляною паличкою та фільтрують. Операцію повторюють 3–4 рази. Фільтрати об'єднують і доводять їхній об'єм 80 % ацетоном до 25 мл. Далі до фільтрату додають 2–3 мл 0,02 N NH<sub>4</sub>OH (з розрахунку 1 мл NH<sub>4</sub>OH на кожні 10 мл водно-ацетонового екстракту) для переведення протохлорофілу у водорозчинну форму.

Суміш переносять у ділильну лійку об'ємом 50–100 мл, додають 0,2 мл насиченого розчину NaCl та 5–7 мл легкого петролейного ефіру (температура кипіння 40–60°C) або етилового ефіру. Вміст ділильної лійки струшують декілька разів і залишають до розділення шарів рідин. В петролейний ефір переходять ліпофільні пігменти, що містять фітол, а у лужній водно-ацетоновій фазі залишаються гідрофільні, безфітольні пігменти – протохлорофіл та хлорофіліди *a* та *b*. Після розділення петролейноефірну та водно-ацетонову фракції збирають в окремі чисті колби.

Водно-ацетоновий шар знову переносять у ділильну лійку, додають 5–7 мл легкого петролейного ефіру і перемішують. Після розділення шарів нижній водно-ацетоновий шар зливають в окрему колбу, а петролейноефірний об'єднують з першою порцією. Екстракцію фітольних форм пігментів повторюють 4–5 разів. Кожний раз петролейноефірну фракцію об'єднують з попередніми порціями. За цього в петролейноефірну фракцію частково переходить протохлорофілід та хлорофіліди. Вони вимиваються з петролейноефірного екстракту 2–3 мл 0,02 N NH<sub>4</sub>OH. Отриманий екстракт (фракції, розчинені в аміаку) об'єднують з водно-ацетоновим розчином.

Безфітольні пігменти (протохлорофілід та хлорофілід), які містяться у водно-ацетоновій фракції, виділяють за допомогою етилового ефіру. Для цього в підкислений до рН 4,5–5,0 за допомогою 0,5–1,0 мл насиченого розчину фосфату натрію однозаміщеного (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, або беруть декілька кристалів сухої солі), до екстракту додають суміш, що складається з 20 мл 80 % ацетону та 30–40 мл діетилового ефіру. За цих умов протохлорофілід та хлорофілід з водорозчинної сольової форми переходить у кислоту, яка розчинна в ефірі та дуже погано розчинна у водно-ацетоновому розчиннику. Розділення проводять в ділильній лійці і повторюють 3–4 рази.

Отриманий екстракт пігментів розводять діетиловим ефіром до певного об'єму і визначають оптичну густину на спектрофотометрі за наступних довжин хвиль:

*Протохлорофілід*..... 623–625 нм;  
*Хлорофілід* ..... 663 нм;  
*Хлорофілід b*..... 664 нм.

Кількість протохлорофіліду в присутності хлорофіліду обчислюють за формулами Коскі (1950):

$$A_{\text{Протохлорофілід}} = \frac{V \cdot (-0.1206 \cdot D_{663} - 0.1619 \cdot D_{664} + 1.0057 \cdot D_{624})}{0.0399 \cdot 1000 \cdot n \cdot d};$$

$$A_{\text{Хлорофілід } a} = \frac{V \cdot (1.0152 \cdot D_{663} - 0.0896 \cdot D_{664} - 0.0037 \cdot D_{624})}{0.0095 \cdot 1000 \cdot n \cdot d};$$

$$A_{\text{Хлорофілід } b} = \frac{V \cdot (-0.1610 \cdot D_{663} + 1.0195 \cdot D_{664} - 0.0301 \cdot D_{624})}{0.0575 \cdot 1000 \cdot n \cdot d},$$

де  $A$  – вміст пігментів, мг/г сирої ваги;

$V$  – об'єм розчину в етиловому ефірі, мл;

$D$  – оптична густина при відповідній довжині хвилі;

$N$  – наважка рослинного матеріалу, г;

$D$  – товщина шару кювети, см (звичайно 1 см).

Для обчислення концентрації хлорофілідів отримані значення множать на коефіцієнт, який дорівнює **0,69** для всіх пігментів.

**Обладнання:** 1) дослідні рослини; 2) водяна баня з електричною плиткою; 3) фільтрувальний папір; 4) фарфорові ступки з товчачиками; 5) фільтр Шотта № 3; 6) колба Бунзена; 7) колби конічні об'ємом 100 та 250 мл; 8) мірні колби об'ємом 25 мл; 9) ділильні лійки об'ємом 100 мл; 10) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 11) мірні циліндри об'ємом 25 та 50 мл; 12) спектрофотометр.

**Реактиви:** 1) розчин аміаку концентрований ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ); 2) петролейний ефір; 3) ацетон; 4) діетиловий ефір; 5) хлорид натрію ( $\text{NaCl}$ ).

### **Контрольні питання**

1. У чому полягає відмінність молекули протохлорофіліду, хлорофіліду та хлорофілу?
2. За яких умов відбувається утворення попередників хлорофілу в рослинах?
3. Назвіть основні етапи виконання роботи.
4. Які пігменти знаходяться у водно-ацетоновій та петролейноєфірній фазах при розділенні пігментів.
5. Як проводиться очищення протохлорофіліду та хлорофіліду від фітольних пігментів?
6. Як отримують розчин пігментів для їхнього кількісного визначення на спектрофотометрі?
7. Дайте характеристику методу фотометрії.
8. Наведіть правила роботи зі спектрофотометром. Чим відрізняється спектрофотометр від фотоелектроколориметра?

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2.6. ВИЗНАЧЕННЯ МІЦНОСТІ ЗВ'ЯЗКУ ХЛОРОФІЛУ З БІЛКАМИ (ЗА І. Л. АЕРОВИМ ТА Д. А. ЛИХОЛАТОМ)**

Відношення пігментів фотосинтетичних комплексів до розчинників залежить від розчинності їх в цих розчинниках і від здатності розчинників



викликати денатурацію пігмент-білкових комплексів. Неполлярні розчинники не вилучають хлорофіл з непорушених його комплексів з білками. Додавання невеликої кількості полярних розчинників до неполярних призводить до часткового видалення хлорофілу.

Дія фізичних, хімічних та інших факторів призводить до часткової денатурації (руйнування) пігмент-білкових комплексів, і хлорофіл частково екстрагується неполярними розчинниками. Таким чином, за кількістю хлорофілу, який екстрагується неполярними розчинниками, можна визначити міцність зв'язку хлорофілу з білками.

**Хід роботи.** Беруть чотири наважки 25–100 мг свіжого рослинного матеріалу, приміщують у фарфорові ступки невеликого розміру і розтирають в присутності 400–600 мг безводного сульфату натрію ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) до однорідної маси. Готують 80 % розчин ацетону та суміш 98 мл петролейного ефіру та 2 мл ацетону. В двох ступках до наважки приливають невеликими порціями суміш петролейного ефіру з ацетоном і ретельно розтирають масу. Гомогенат кількісно переносять на фільтр Шотта № 3, змиваючи ступку і товкачик сумішшю, і фільтрують. Фільтрування зупиняють, коли об'єм фільтрату досягне 20 мл. Фільтрат відкидають, а осад на фільтрі сушать потоком повітря. Далі до залишку додають 80 % ацетон в кількості 2–3 мл, перемішують і фільтрують.

Промивання осаду на фільтрі проводять до тих пір, доки фільтрат не стане прозорим і безбарвним. Об'єм екстракту доводять до 10 мл і переміщують у темряву. В двох інших ступках гомогенат відразу заливають 80 % ацетоном, розтирають його і фільтрують у чисті сухі пробірки. Об'єм цих екстрактів також доводять до 10 мл. Далі визначають оптичну густину всіх чотирьох екстрактів на спектрофотометрі за довжин хвиль 665 та 649 нм, і обчислюють концентрації пігментів за формулою Вернона (перераховуючи його на наважку рослинного матеріалу):

$$C_{a+b} = 6.45 \cdot D_{665} + 17.72D_{649} ,$$

де  $D_{665}$  – оптична густина розчину пігментів при довжині хвилі 665 нм;

$D_{649}$  – оптична густина розчину пігментів при довжині хвилі 649 нм.

Міцність зв'язку хлорофілу з ліпопротеїдним комплексом розраховують за формулою:

$$X = \frac{C}{C_1} \cdot 100 ,$$

де  $X$  – міцність зв'язку хлорофілу з білком, %;

$C$  – концентрація пігментів у витяжці, отриманій після обробки наважки сумішшю петролейного ефіру з ацетоном, мг/л;

$C_1$  – концентрація пігментів у витяжці, отриманій шляхом екстракції пігментів 80 % ацетоном, мг/л.

**Обладнання:** 1) дослідні рослини; 2) фарфорові ступки з товкачками; 3) фільтр Шотта № 3; 4) колба Бунзена; 5) колби конічні об'ємом 100 та

250 мл; 6) піпетки об'ємом 1 та 5 мл; 7) мірні циліндри об'ємом 100 мл; 8) мірні пробірки об'ємом 10 мл; 9) штатив для пробірок; 10) скляні палички; 11) спектрофотометр.

**Реактиви:** 1) сульфат натрію безводний ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ); 2) ацетон; 3) петролейний ефір.

### **Контрольні питання**

1. У чому полягає принцип методу визначення міцності зв'язку хлорофілу з білками?
2. Наведіть приклади полярних та неполярних розчинників.
3. Дія яких фізичних, хімічних та біологічних факторів є причиною денатурації комплексів хлорофілу з білком?
4. Для чого в роботі використовується безводний сульфат натрію?
5. З якою метою в роботі використовується суміш петролейного ефіру з ацетоном?
6. Якими речовинами в роботі можна замінити ацетон та петролейний ефір?
7. Якими одиницями виражається міцність зв'язку хлорофілу з білком?

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2.7. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ХЛОРОФІЛАЗИ**

Фермент хлорофілаза каталізує останню реакцію біосинтезу хлорофілу – приєднання фітолу до хлорофіліду з утворенням хлорофілу. Реакція може йти як в прямому, так і в зворотному напрямку. В умовах *in vitro* хлорофілаза каталізує руйнування молекули хлорофілу.

Методи визначення активності ферменту засновані на визначенні кількості хлорофілу до та після дії ферменту. Про активність ферменту роблять висновок за збільшенням кількості хлорофіліду у зразку за визначений термін інкубації пігменту з препаратом ферменту.

**Хід роботи.** Беруть дві наважки листя по 0,5 г, приміщують в дві фарфорові ступки. Одну з наважок розтирають в присутності 80 % ацетону і  $\text{CaCO}_3$  або  $\text{MgCO}_3$ . Гомогенат переносять на скляний фільтр № 3 і фільтрують. Екстракцію пігментів проводять малими порціями 80 % ацетону до отримання перших крапель безбарвного фільтрату. Отриманий фільтрат переносять у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводять об'єм 80 % ацетоном до мітки.

У другій наважці (дослідній) визначають вміст хлорофілу після дії хлорофілази. Для цього наважку розтирають в ступці з 5 мл 60 % ацетону та невеликою кількістю  $\text{CaCO}_3$  або  $\text{MgCO}_3$ . Розтерту масу переносять на скляний фільтр № 3 і фільтрують. Екстракцію пігментів проводять декілька разів малими порціями 80 % ацетону до отримання безбарвного фільтрату,

що витікає з фільтру. Отриманий фільтрат переносять у мірну колбу і доводять об'єм фільтрату до 25 мл 60 % ацетоном. Екстракт пігментів інкубують за температури 23 °С протягом однієї години у темряві. Реакцію зупиняють, додаючи в екстракт 100 % ацетон з таким розрахунком, щоб концентрація ацетону в екстракті становила 80 %. Рідину фільтрують через скляний фільтр і доводять її об'єм в мірній колбі 80 % ацетоном до 100 мл.

Кількість хлорофіліду в першому (контрольному) та другому (дослідному) екстрактах визначають за методом Веста та Мак-Кінні. Контрольний екстракт поділяють на дві частини по 25 мл. Першу частину залишають у темряві для визначення суми зелених пігментів, а в другій частині визначають вміст хлорофіліду. Для цього з екстракту за допомогою петролейного ефіру видаляють пігменти, що містять фітол. До 25 мл екстракту додають 2,5 мл 0,02 М NH<sub>4</sub>OH і суміш переносять у ділильну лійку. В лійку додають 0,2 мл насиченого розчину хлориду натрію (NaCl) та 5 мл легкого петролейного ефіру (температура кипіння 40–60°C). Суміш в лійці енергійно струшують декілька разів і залишають до розділення суміші на два шари. В петролейний ефір перейдуть хлорофіли та каротиноїди, а у водно-ацетоновому шарі залишаться хлорофіліди. Водно-ацетоновий шар зливають у чисту колбу, а фракцію петролейного ефіру відкидають. Водно-ацетонову фракцію знову переносять у ділильну лійку, наливають петролейний ефір до початкового об'єму і повторюють екстракцію пігментів, що містять фітол. Відмивання водно-ацетонової фракції від жиророзчинних пігментів повторюють 3–4 рази. Після останнього промивання об'єм водно-ацетонового екстракту доводять у мірній колбі до 25 мл 80 % ацетоном.

Аналогічно виділяють хлорофілід і в дослідній витяжці. Беруть 25 мл екстракту після інкубації ферменту, додають 2,5 мл 0,02 М розчину аміаку (NH<sub>4</sub>OH), переносять у ділильну лійку, додають 0,2 мл насиченого розчину хлориду натрію (NaCl) та 5 мл легкого петролейного ефіру. Суміш енергійно струшують декілька разів і залишають для відстоювання. Екстракцію хлорофілів, як і в попередньому випадку, повторюють 3–4 рази. Наприкінці об'єм водно-ацетонового фільтрату доводять 80 % ацетоном до 25 мл.

Визначають оптичну густину отриманих витяжок на спектрофотометрі за довжини хвилі 652 нм. В першій контрольній витяжці визначають суму зелених пігментів та хлорофілідів. У другій контрольній витяжці та дослідній витяжці визначають хлорофілід. Концентрацію суми хлорофілів обчислюють за формулою Арнона (цит. за Гавриленко В. Ф. та ін., 1975):

$$C_{a+b} = \frac{D_{652} \cdot 1000}{34.5} .$$

Для обчислення концентрації хлорофіліду використовують ту ж формулу з коефіцієнтом 0,69:

$$C_{a+b} = \frac{D_{652} \cdot 1000}{34.5} \cdot 0.69 .$$

Вміст суми зелених пігментів та хлорофілідів на 1 г сирого рослинного матеріалу розраховують за формулою:

$$A = \frac{C \cdot V}{n \cdot 1000} ,$$

- де  $A$  – вміст пігментів в рослинному матеріалі, мг/г;  
 $C$  – концентрація пігментів в екстракті, мг/1000 мл;  
 $V$  – об'єм витяжки пігментів, мл;  
 $n$  – наважка рослинного матеріалу, г.

Про активність хлорофілази роблять висновок за кількістю хлорофіліду, який утворився в дослідній пробі після однієї години інкубації. Активність ферменту виражають у відсотках до загального вмісту зелених пігментів в контрольному варіанті. Для зручності результати заносять до таблиці.

Варіант	Оптична густина розчину	Вміст пігментів у зразку		Активність ферменту, %
		мг	%	
Сума пігментів (хлорофіл + хлорофілід) в контролі				
Вміст хлорофіліду в контролі				
Вміст хлорофіліду в досліді				

**Обладнання:** 1) дослідні рослини; 2) водяна баня з електричною плиткою; 3) фільтрувальний папір; 4) фарфорові ступки з товчачиками; 5) фільтр Шотта № 3; 6) колба Бунзена; 7) колби конічні об'ємом 100 та 250 мл; 8) мірні колби об'ємом 25 мл; 9) ділильні лійки об'ємом 100 мл; 10) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 11) мірні циліндри об'ємом 25 та 50 мл; 12) спектрофотометр.

**Реактиви:** 1) розчин аміаку концентрований ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ); 2) петролейний ефір; 3) ацетон; 4) діетиловий ефір; 5) хлорид натрію ( $\text{NaCl}$ ).

### Контрольні питання

1. Яку функцію виконує хлорофілаза?
2. У чому полягає принцип методу визначення активності хлорофілази?
3. З якою метою для екстракції, пігментів у контрольному варіанті використовують 80 %-ний ацетон, а в дослідному – 60 %-ний?
4. Як обчислити кількість 100 %-ного ацетону для інактивації ферменту?
5. Яких умов оточуючого середовища (рН, температура) потрібно дотримуватися для визначення активності ферменту?
6. З якою метою водно-ацетонову витяжку пігментів обробляють петролейним ефіром?
7. У яких одиницях вимірюється активність хлорофілази? Кількість яких пігментів потрібно знати, щоб обчислити активність ферменту?

### 3. СВІТЛОВА СТАДІЯ ФОТОСИНТЕЗУ

#### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 3.1. ОТРИМАННЯ СУСПЕНЗІЇ ІЗОЛЬОВАНИХ ХЛОРОПЛАСТІВ З ЛИСТЯ РОСЛИН

Отримання функціонально активних препаратів ізольованих хлоропластів необхідно для вивчення їхньої фосфорилуючої та відновлювальної активності, визначення хімічного складу, структури та інших властивостей. Для виділення хлоропластів з рослинної тканини використовують методи диференційного центрифугування у градієнті густини. Цей метод включає в себе розтирання листя із середовищем виділення, приготування гомогенату і його наступне центрифугування зі швидкостями, які дозволяють відокремити фракцію хлоропластів від інших, більш легких, компонентів клітини. За визначення відновлювальної активності хлоропластів звичайно використовують водні середовища виділення:

- 0,35 M NaCl у 0,05 M трис-HCl буфері, pH 8,0;
- 0,30 M NaCl у 0,06 M фосфатному буфері, pH 6,9;
- 0,40 M сахароза та 0,01 M KCl у 0,05 M фосфатному буфері, pH 6,9.

**Хід роботи.** Всі операції, з виділення хлоропластів проводять за температури 0–4°C. Беруть наважку листя в кількості 2 г, переміщують у поліетиленовий пакет і заморожують в холодильнику протягом 20 хв. Наважку подрібнюють у фарфоровій ступці, яка ззовні охолоджується льодом, з п'ятикратною кількістю (за вагою) середовища виділення (0,30 M NaCl у 0,06 M фосфатному буфері, pH 6,9).

Отриманий гомогенат фільтрують через подвійний шар тканини, а фільтрат центрифугують на рефрижераторній центрифугі за 800 об/хв (1000 g) протягом 5 хв. Осад, який містить шматки тканин, ядра, зруйновані клітинні оболонки та інші фрагменти клітин, відкидають. Надосадову рідину (супернатант) використовують для осадження хлоропластів. Для цього його знову центрифугують на рефрижераторній центрифугі за 2500 об/хв (1000 g) протягом 15 хв. Після центрифугування надосадову рідину зливають, а осад, який містить хлоропласти, промивають середовищем виділення і знову центрифугують за 2500 об/хв протягом 15 хв. Супернатант зливають, а хлоропласти (осад) гомогенізують і об'єм гомогенату доводять до 30–40 мл середовищем виділення. Отриманий препарат хлоропластів необхідно зберігати за 0–3°C. За цих умов активність хлоропластів зберігається протягом декількох годин.

**Визначення кількості хлорофілу в суспензії хлоропластів.** Беруть 2 мл суспензії хлоропластів у хімічний стакан об'ємом 50 мл, додають 8 мл 100 % ацетону, ретельно перемішують і фільтрують через скляний фільтр Шотта № 3, з'єднаний з колбою Бунзена.

Об'єм отриманого фільтрату доводять 80 % ацетоном до 10 мл, перемішують і вимірюють оптичну густину розчину на спектрофотометрі

за довжини хвилі 652 нм. В якості контрольного розчину використовують 80 % ацетон. Концентрацію хлорофілу обчислюють за формулою Арнона:

$$C_{a+b} = \frac{D_{652} \cdot 1000}{34.5}.$$

Вміст хлорофілу в 1 мл суспензії розраховують за формулою:

$$A = \frac{C_{a+b} \cdot 10}{1000 \cdot 2}.$$

**Обладнання:** 1) дослідні рослини; 2) поліетиленові пакети; 3) холодильник; 4) фарфорові ступки з товчачиками; 5) тканина для фільтрування; 6) рефрижераторна центрифуга; 7) скляні фільтри Шотта № 3; 8) колба Бунзена; 9) хімічні стакани об'ємом 50 мл; 10) спектрофотометр.

**Реактиви:** 1) хлорид натрію (NaCl); 2) фосфат натрію однозаміщений ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); 3) фосфат натрію двозаміщений ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ); 4) ацетон.

### **Контрольні питання**

1. Які методи існують для виділення хлоропластів? Наведіть їхню характеристику.
2. Яких умов потрібно дотримуватися під час виділення хлоропластів? Як довго може зберігатися їхня активність за дотримання умов виділення?
3. Як можна визначити вміст хлорофілу в суспензії хлоропластів? Для чого потрібно знати цей показник?
4. Чому для виділення хлоропластів використовують водні середовища, а не органічні?

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 3.2. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ФОТОХІМІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ХЛОРОПЛАСТІВ ЗА ШВИДКІСТЮ ВІДНОВЛЕННЯ 2,6-ДИХЛОРФЕНОЛІНДОФЕНОЛУ (ДХФІФ)**

За рН 6,5 2,6-дихлорфеноліндофенол в окисленому стані має синє забарвлення. Під час відновлення він переходить у безбарвну сполуку. Швидкість знебарвлення барвника є мірилом відновлювальної активності хлоропластів.

**Хід роботи.** Для визначення фотохімічної активності готують суспензію хлоропластів, яка містить в 1 мл близько 5–10 мкг хлорофілу. В дві пробірки наливають по 5 мл реакційної суміші: 4 мл суспензії хлоропластів

+ 1 мл  $1 \cdot 10^{-4}$  М розчину ДХФІФ. Одна пробірка використовується в якості темного контролю (повинна знаходитися в темряві). Друга пробірка приміщується в хімічний стакан і освітлюється. Оптична густина розчинів дослідної (світло) та контрольної (темрява) пробірок вимірюється за 620 нм проти стандартного розчину (4 мл суспензії хлоропластів + 1 мл води) перед дослідом та кожні 30 сек протягом 2 хв.

Розраховують зміни оптичної густини розчинів за час дослід (t<sub>0</sub>-t<sub>4</sub>) для дослідного та контрольного зразків та вносять поправку на відновлення барвника у темряві. Повторність дослідів двократна. Результати дослідів заносять до таблиці:

Варіант	Оптична густина ( $D_{620}$ )				
	0	1	2	3	4
Дослід (світло)					
Контроль (темрява)					
Дослід (світло)					
Контроль (темрява)					

Активність реакції виражається зміною оптичної густини ( $D_{620}$ ) за 1 год на 1 мг хлорофілу або в мікромолях відновленого акцептору (ДХФІФ) за 1 год на 1 мг хлорофілу:

$$A = \frac{D_{620} \cdot 60}{t \cdot n},$$

де  $A$  – активність ферменту, виражена у зміні оптичної густини за 1 год на 1 мг хлорофілу;

$D_{620}$  – оптична густина розчину при довжині хвилі 620 нм;

$t$  – час дослідів, хвилин;

$n$  – наважка хлорофілу в реакційному середовищі, мг.

**Обладнання:** 1) суспензія хлоропластів; 2) пробірки; 3) піпетки об'ємом 1 та 5 мл; 4) стакани об'ємом 100 мл; 5) секундомір; 6) спектрофотометр.

**Реактиви:** 2,6-дихлорфеноліндофенол.

### Контрольні питання

1. Як можна визначити фотохімічну активність хлоропластів?
2. Яке значення в життєдіяльності рослин відіграє здатність хлоропластів до фотовідновлення?

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 3.3. ДІЯ ІНГІБІТОРІВ НА ШВИДКІСТЬ ФОТОВІДНОВЛЕННЯ АКЦЕПТОРІВ В РЕАКЦІЇ ХІЛЛА

Система фотоокислення води являє собою складний ферментативний комплекс, чутливий до дії інгібіторів. Відомими інгібіторами реакцій фото-системи II є моно- та диурони, гідроксиламін, о-фенантролін. Аналіз дії інгібіторів дуже широко застосовується під час досліджень ферментативного комплексу фотоокислення води, структури електрон-транспортного ланцюга, природи та локалізації окремих її компонентів та інших питань механізму фотосинтезу.

Під час вивчення дії інгібіторів на швидкість фотовідновлення ДХФІФ або  $K_3Fe(CN)_6$  використовують суспензію хлоропластів, приготовлену звичайним способом (лабораторна робота 3.1). У роботі використовують гідроксиламін (концентрація  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ М) або діурон (концентрація  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  М). Для приготування діурону наважку розчиняють у 0,5–1 мл етилового спирту та доводять об'єм до потрібного дистильованою водою. Гідроксиламін використовують у вигляді водного розчину.

Реакційні суміші контрольного (темрява) та дослідного (освітлення) зразків містять наступні кількості реагентів:

**контроль** – 3,5 мл суспензії хлоропластів, еквівалентні 0,1 мг хлорофілу; 1,0 мл  $K_3Fe(CN)_6$  в концентрації  $2 \cdot 10^{-3}$  М або ДХФІФ у концентрації  $1 \cdot 10^{-4}$  М (акцептори електронів); 0,5 мл води;

**дослід** – 3,5 мл суспензії хлоропластів, еквівалентне 0,1 мг хлорофілу; 1,0 мл акцептору електронів; 0,5 мл розчину інгібітору.

Якщо в якості акцептору електронів використовується ДХФІФ, то визначення активності фотовідновлення проводиться аналогічно тому, як описано в попередньому методі. За використання  $K_3Fe(CN)_6$  беруть дві дослідні та дві контрольні пробірки. Контрольні пробірки приміщують у темряву, а дослідні освітлюють. Виміри оптичної густини проводять за довжини хвилі 420 нм через кожну хвилину протягом 4–5 хв. Температуру в дослідній та контрольній пробах підтримують в межах 15–18°C. Обчислюють зміни оптичної густини під час досліду для дослідної та контрольної проб з поправкою на відновлення акцептору у темряві. Кількість відновленого фериціаніду калію в мікромолях розраховують, використовуючи мілімолярний коефіцієнт, який дорівнює 1,04.

Фотохімічну активність виражають в мікромолях фериціаніду калію, відновленого за 1 год 1 мг хлорофілу.

**Обладнання:** 1) суспензія хлоропластів; 2) пробірки; 3) піпетки об'ємом 1 та 5 мл; 4) спектрофотометр.

**Реактиви:** 1) гідроксиламін; 2) діурон; 3) 2,6-діхлорфеноліндофенол; 4) фериціанід калію ( $K_3Fe(CN)_6$ ).



### Контрольні питання

1. Які функції в процесі фотосинтезу виконує ферментативна система фотоокислення води?
2. На яких етапах фотовідновлення діють інгібітори? Назвіть основні інгібітори, які використовуються під час вивчення процесів фотосинтезу.
3. Наведіть характеристику принципу методу визначення дії інгібіторів на швидкість фотовідновлення.
4. Навіщо потрібні контрольні пробірки, які знаходяться у темряві?

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 3.4. ВПЛИВ РОЗ'ЄДНУВАЛЬНИХ ФОТОФОСФОРИЛУВАННЯ АГЕНТІВ НА ШВИДКІСТЬ ВІДНОВЛЕННЯ АКЦЕПТОРІВ В РЕАКЦІЇ ХІЛЛА

Деякі сполуки –  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , етилендіамінтетраацетат натрію (ЕДТА), метиламіногідрохлорид ( $\text{CH}_3\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ ) – відомі як агенти, що роз'єднують фотофосфорилування. Діючи на стадії утворення багатого енергією інтермедіата  $X_e$ , роз'єднувальні агенти блокують синтез АТФ, але не порушують електрон-транспортний ланцюг.

За введення цих сполук у фотофосфорилюючу систему ізольованих хлоропластів спостерігається пригнічення процесів фотофосфорилування. Загальний потік електронів під час цього, як правило, активується («ефект роз'єднання»). Активацію потоку електронів можна визначити за швидкістю відновлення штучних акцепторів електронів (фериціанід калію).

Під час вивчення дії роз'єднувальних агентів на швидкість потоку електронів в ланцюгу використовують наступні концентрації роз'єднувачів:

$\text{NH}_4\text{Cl}$ .....	$10^{-3} - 10^{-4} \text{ M}$ ;
ЕДТА .....	$10^{-2} - 10^{-3} \text{ M}$ ;
$\text{CH}_3\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ .....	$1, 2^{-2} \text{ M}$ .

Для визначення швидкості відновлення акцептору готують 4 пробірки з реакційною сумішшю (2 дослідних та 2 контрольних), яка складається з наступних компонентів:

Компонент	Вміст (мкмоль)
трис- $\text{HCl}$ буфер рН 7,8	75
$\text{NaCl}$	100
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	2
$\text{MgCl}_2$	20
Na, K фосфат	20
АДФ	4
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (в контролі – $\text{H}_2\text{O}$ )	5
Суспензія хлоропластів (еквівалентно кількості хлорофілу, мкг)	100

Об'єм реакційної суміші доводять дистильованою водою до 5 мл і визначають оптичну густину розчинів в освітленій пробірці (дослід) та пробірці, яка знаходиться в темряві (контроль) за довжини хвилі 420 нм протягом 4–5 хв через кожну хвилину. Обчислюють кількість відновленого фериціаніду в дослідному та контрольному варіантах у мкмоль/мг хлорофілу за 1 год та визначають відсоток стимуляції потоку електронів за дії  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

**Обладнання:** 1) суспензія хлоропластів; 2) пробірки; 3) піпетки об'ємом 1 та 5 мл; 4) спектрофотометр.

**Реактиви:** 1) хлорид амонію ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ); 2) трис; 3) хлорид магнію ( $\text{MgCl}_2$ ); 4) фосфат натрію або калію ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ); 5) АДФ; 6) фериціанід калію ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ); 6) соляна кислота ( $\text{HCl}$ ).

### **Контрольні питання**

1. Назвіть основні етапи перенесення електронів у електрон-транспортному ланцюзі.
2. Як здійснюється фотофосфорилування?
3. На яких етапах фотофосфорилування діють інгібітори? Назвіть основні інгібітори, які використовуються під час вивчення процесів фотосинтезу.
4. Дайте характеристику методу визначення дії інгібіторів на швидкість перенесення електронів.
5. Навіщо потрібні контрольні пробірки, які знаходяться у темряві?

## 4. ТЕМНОВА СТАДІЯ ФОТОСИНТЕЗУ

Темнова стадія фотосинтезу являє собою ланцюг біохімічних ферментативних реакцій, в результаті яких фіксується вуглекислий газ ( $\text{CO}_2$ ) та утворюються цукри та інші органічні сполуки. Про інтенсивність процесу утворення органічних сполук при фотосинтезі можна судити декількома методами. Перш за все інтенсивність фотосинтезу визначають за кількістю поглинутого діоксиду вуглецю, або виділеного кисню. Друга група методів заснована на обліку кількості органічної речовини, яка утворилася за певний проміжок часу на одиницю площі листової поверхні або одиницю маси фотосинтетичного органу. Для визначення інтенсивності фотосинтезу за кількістю поглинутого вуглекислого газу використовують кондуктометрію, газометрію, інфрачервоний газоаналіз та деякі інші методи. Накопичення органічної речовини найчастіше визначають хімічними методами.

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4.1. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ФОТОСИНТЕЗУ ЗА ДОПОМОГОЮ ІНФРАЧЕРВОНОГО ГАЗОАНАЛІЗАТОРА

**Хід роботи.** Для визначення інтенсивності фотосинтезу за допомогою інфрачервоного газоаналізатора використовують протягування повітря через асиміляційні камери з наступним визначенням вмісту  $\text{CO}_2$  у повітрі. Як правило, використовується диференційна схема, тобто паралельно вимірюється вміст діоксиду вуглецю у контрольному повітрі.

Для таких вимірів можуть використовуватися різноманітні схеми. Наприклад, багатоканальна установка, яка дозволяє досліджувати газообмін 4 рослинних зразків та склад контрольного повітря (Рис. 6). Установка складається з регуляторів потоку повітря (1), чотирьох асиміляційних камер (2), осушувачів повітря (3) та пневмоперемичачів (4).

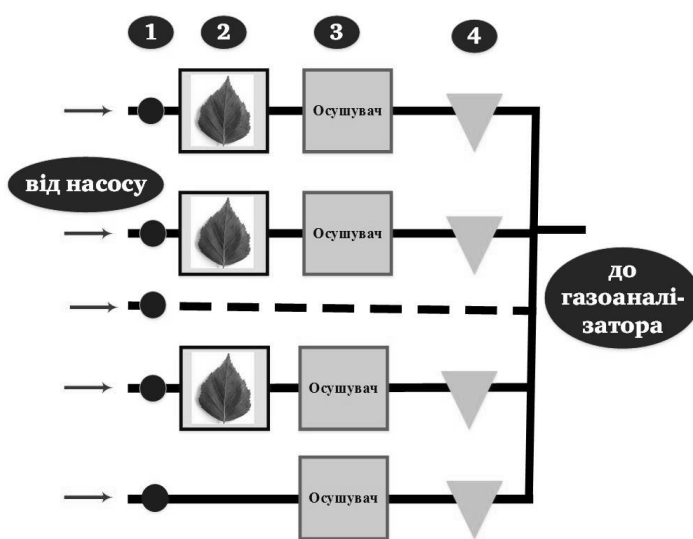


Рис. 6 – Схема установки для визначення інтенсивності фотосинтезу

(2), осушувачів повітря (3) та пневмоперемичачів (4).

Асиміляційні камери призначені для приміщення дослідних об'єктів. Конструкція камер визначається формою та розмірами асиміляційної поверхні дослідного об'єкту. Вони мають два отвори – вхідний та вихідний. Кришка камери повинна герметично закривати камеру.

Осушувачі забезпечують видалення пари води у повітрі, що пройшло через асиміляційні камери, а пнев-

моперемикачі перемикають канали і комутують потік повітря з них на інфрачервоний газоаналізатор. Кожний з пневмоперемикачів спрямовує свій потік на 15 сек у оптичну систему газоаналізатора. Проби повітря інших каналів у цей час скидаються.

Інтенсивність фотосинтезу вимірюється наступним чином. У асиміляційні камери приміщуються листки, пагони або проростки дослідних рослин (залежно від мети дослідження), які знаходяться у воді або ґрунті. Камери герметично закриваються кришками. Для цього кришки притирають до камер, використовуючи вакуумну змазку. До вхідного отвору приєднується компресор або посудина, що забезпечує розподіл повітря між каналами. До вихідного отвору приєднується осушувач. Встановлюють певну швидкість потоку повітря через камери (близько 30 л/год.), регулюючи швидкість проходження повітря регулятором розходу. Швидкість потоку повітря залежить від площі листка та інтенсивності процесу фотосинтезу. Її встановлюють на основі попередніх дослідів.

Протягом 10–20 хв реєструють рівень газообміну у темряві для урахування виділення  $\text{CO}_2$  під час дихання. Далі дослідні рослини освітлюють і вивчають фотосинтетичний газообмін. Після встановлення стабільного рівня фотосинтезу знімають показання протягом визначеного часу.

Для вимірювання вмісту вуглекислого газу у контрольному та дослідних показниках повітря використовують інфрачервоні газоаналізатори діоксиду вуглецю (напр., IAQ-CO<sub>2</sub>-3001-RH, ST-54, інфрачервоний газоаналізатор  $\text{CO}_2$  тощо).

Розрахунки інтенсивності фотосинтезу проводяться за формулами:

$$X_{\text{mgCO}_2/\text{год}\cdot\text{дм}^2} = \frac{C \cdot V}{S}$$

або

$$X_{\text{mgCO}_2/\text{год}\cdot\text{дм}^2} = \frac{C \cdot V}{P},$$

де  $C$  – вміст діоксиду вуглецю у повітрі, %;

$V$  – швидкість потоку повітря, л/год;

$S$  – площа листя,  $\text{дм}^2$ ;

$P$  – маса листя, г.

**Обладнання:** 1) асиміляційні камери; 2) компресор; 3) осушувачі повітря; 4) регулятори та вимірювачі швидкості потоку повітря; 5) інфрачервоний газоаналізатор.

**Реактиви:** безводні хлорид кальцію ( $\text{CaCl}_2$ ), хлорид цинку ( $\text{ZnCl}_2$ ) або концентрована сірчана кислота ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) для заповнення осушувачів.

### **Контрольні питання**

1. Дайте характеристику процесу фотосинтезу. Його значення.

2. Наведіть принцип дії методу інфрачервоного газоаналізу. Навіщо потрібно висушувати повітря перед виміром концентрації  $\text{CO}_2$  в ньому?
3. Як підготувати рослинний матеріал для визначення фотосинтезу?
4. Навіщо потрібно вимірювати вміст диоксида вуглецю у контрольній пробі та у затемнених асиміляційних камерах?
5. Чи можна за допомогою цього методу виміряти інтенсивність дихання? Яким чином?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4.2. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ФОТОСИНТЕЗУ ЗА ПОГЛИНАННЯМ $\text{CO}_2$ У ПОТОЦІ ПОВІТРЯ КОНДУКТОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

Визначення інтенсивності процесів фотосинтезу в потоці повітря – найкращий метод оцінки процесів, які відбуваються за реальних умов. На відміну від замкненого простору, інтенсивність процесів асиміляції не обмежується об'ємом та загальним вмістом  $\text{CO}_2$ . Найкращим способом визначення інтенсивності фотосинтезу є оцінка швидкості поглинання  $\text{CO}_2$  з атмосферного повітря рослинами на світлі.

Найчастіше оцінка інтенсивності фотоасиміляційних процесів рослин у потоці повітря проводиться за зменшенням вуглекислоти. Запропонований

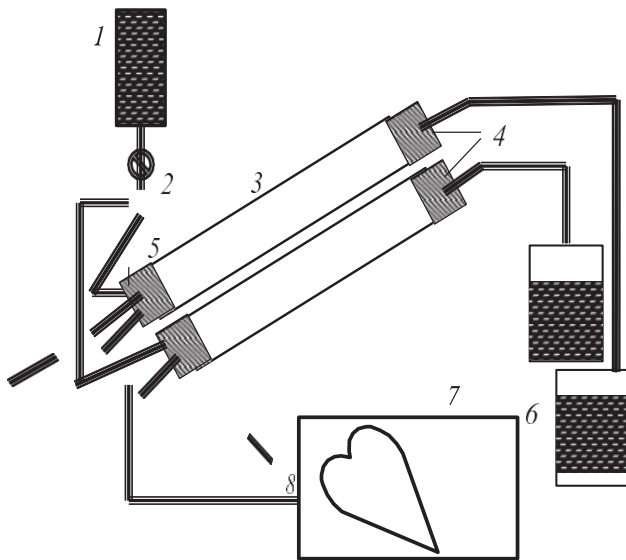


Рис. 7 – Схема приладу для визначення інтенсивності фотосинтезу у потоці повітря:

1 – посудина з розчином лугу; 2 – кран;  
3 – поглинальні посудини; 4, 5 – гумові пробки; 6 – аспіратори; 7 – листова камера; 8 – листок рослини

спосіб заснований на порівнянні кількості  $\text{CO}_2$  у вихідному повітрі та після проходження повітря над рослиною або листком. Вимір кількості  $\text{CO}_2$  в повітрі здійснюється за допомогою її поглинання лугом ( $\text{NaOH}$  або  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ). Зміну концентрації лугу визначають титруванням або виміром електропровідності.

**Хід роботи.** Прилад, який використовується для виконання лабораторної роботи, складений за диференціальною схемою: через дві колонки з розчином поглинача одночасно пропускаються однакові об'єми повітря. Але через першу колонку проходить просто повітря переміщення, а через другу – повітря, яке проходить над листям рослини через

листову камеру. Під час оцінки інтенсивності фотосинтезу вважають, що весь  $\text{CO}_2$  поглинається розчином луку, а кількість асимільованої рослиною вуглекислоти дорівнює різниці між кількістю  $\text{CO}_2$ , яка міститься у вихідному повітрі, та кількістю  $\text{CO}_2$  після проходження його над рослиною. Для виконання цих умов швидкість протягування повітря повинна бути невисокою, що забезпечується аспіраторами (6, Рис. 7).

Для визначення інтенсивності фотосинтезу поглинальні посудини (3) заповнюють розчином гідроксиду натрію (NaOH). Через одну з посудин (контрольну) пропускають повітря, через другу (дослідну) проходить повітря, яке пройшло через листову камеру (7) над дослідним листком. Для отримання правильних результатів швидкість прокачування повітря через поглинальні посудини повинна бути однаковою.

Потік повітря регулюють таким чином, щоб пухирці повітря були розташовані в ряд з проміжками 0,5–1,0 см, а самі пухирці мають бути діаметром не більше 0,5 см. Для визначення потрібно знати об'єм повітря, яке пройшло через поглинальні посудини, та час проведення визначення.

Далі за допомогою кондуктометра вимірюють електропровідність розчинів луку у контрольній та дослідній посудинах згідно з інструкцією з роботи з приладом. За результатами вимірів визначається кількість диоксиду вуглецю у контрольному і дослідному повітрі та знаходиться кількість  $\text{CO}_2$ , яку поглинув листок. Вимірюється площа листка та обчислюється інтенсивність фотосинтезу за формулою:

$$I = \frac{A}{S \cdot t},$$

де  $I$  – інтенсивність фотосинтезу, мг  $\text{CO}_2/\text{дм}^2 \cdot \text{год}$ ;

$A$  – кількість  $\text{CO}_2$ , яку поглинув листок за час дослідження, мг;

$S$  – площа листка,  $\text{дм}^2$ ;

$t$  – час дослідження, год.

**Обладнання:** 1) листки рослин; 2) стакани хімічні об'ємом 50 мл; 3) освітлювач; 4) секундомір; 5) прилад для визначення фотосинтезу; 6) кондуктометр.

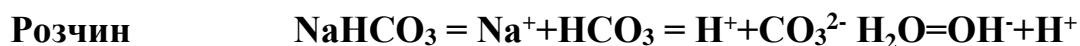
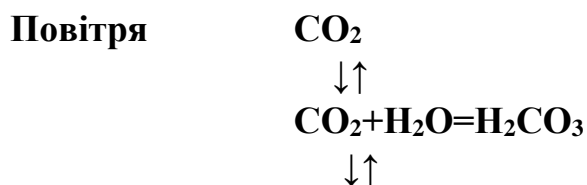
**Реактиви:** 0,1 М розчин гідроксиду натрію (NaOH).

#### **Контрольні питання**

1. Наведіть характеристику кондуктометричного визначення  $\text{CO}_2$ .
2. Охарактеризуйте послідовність операції з визначення інтенсивності фотосинтезу кондуктометричним методом.
3. Яких умов потрібно дотримуватися для уникнення похибок під час визначення інтенсивності фотосинтезу цим методом?

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4.3. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ФОТОСИНТЕЗУ ЗА МЕТОДОМ ОЛВІКА–ЦЕЛЛЕРА

Інтенсивність фотосинтезу визначається за кількістю вуглекислого газу, яка поглинається в процесі фотосинтезу одним м<sup>2</sup> листя за 1 год. Принцип методу полягає в тому, що розчин бікарбонату натрію має властивість приходити у рівновагу з CO<sub>2</sub> в повітрі, яке знаходиться над ним. Якщо вміст його у повітрі стане меншим, то розчин віддає CO<sub>2</sub> у повітря, та навпаки. У зв'язку з віддачею або поглинанням розчином CO<sub>2</sub> змінюється його рН. Рівновагу, що встановлюється у системі повітря↔розчин, можна представити наступним чином:



З цієї схеми витікає, що за зменшення вмісту CO<sub>2</sub> у повітрі відбувається віддача CO<sub>2</sub> з розчину. Внаслідок цього концентрація H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> та її іонів зменшується та відбувається накопичення іонів OH<sup>-</sup>, і розчин стає більш лужним. З цього видно, що кожному парціальному тиску CO<sub>2</sub> в повітрі відповідає певна концентрація іонів H<sup>+</sup> у розчині бікарбонату натрію. Величину рН розчину NaHCO<sub>3</sub> визначають, порівнюючи зі шкалою, яку готують на основі боратних буферних сумішей (табл. 1Д).

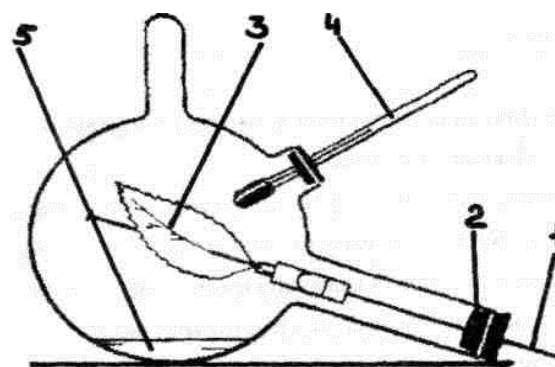


Рис. 8 – Асиміляційна колба:  
1 – скляна паличка; 2 – пробка;  
3 – рослина; 4 – термометр;  
5 – розчин бікарбонату натрію  
(NaHCO<sub>3</sub>)

**Хід роботи.** В асиміляційну колбу ємністю 500–700 мл вводять 3 мл 0,001 N розчину NaHCO<sub>3</sub> і 2 краплини 0,2 %-ного розчину індикатора крезолового червоного. Колбу залишають відкритою на 5 хв для встановлення рівноваги між вмістом CO<sub>2</sub> в повітрі і розчині. Далі за шкалою (табл. 2Д) визначають рН розчину NaHCO<sub>3</sub>.

Для визначення площі листка обводять його контур або контури листків на гілочці на кальці, зважують на електронних терезах. Зважують 100 см<sup>2</sup> кальки та за пропорцією розраховують площу листка:

$$S_{\text{листка}} = \frac{P_{\text{листка}} \cdot 100}{P_{\text{кальки}}},$$

де  $S_{\text{листка}}$  – площа листової пластинки, см<sup>2</sup>;

$P_{\text{листка}}$  – маса листка, г;

$P_{\text{кальки}}$  – маса зразкового аркушу кальки, г;

$100$  – площа зразкового аркушу кальки, см<sup>2</sup>.

У колбу приміщують гілочку або листок, що прив'язують до скляної палички, яка пропущена через пробку. Попередньо листок або пагін зрізають під водою та зріз обгортають мокрим фільтрувальним папером (Рис. 8). Колбу з рослиною щільно закривають пробкою (для герметичності заліплюють пластиліном) та визначають рН.

Колбу на 30 хв ставлять на яскраве світло. Одночасно вимірюють температуру за допомогою термометра, який вставлений у отвір пробки. Через 30 хв знову вимірюють рН розчину в колбі. За таблицею 2Д визначають початковий вміст CO<sub>2</sub> в розчині та його кількість після досліду. Розраховують кількість вуглекислого газу, яка використана в процесі фотосинтезу.

Далі обчислюють інтенсивність фотосинтезу  $I_{\phi}$  в мг CO<sub>2</sub> на 1 м<sup>2</sup> на год за наступною формулою:

$$I_{\phi} = \frac{A_{CO_2} \cdot 10000}{S \cdot t},$$

де  $I_{\phi}$  – інтенсивність фотосинтезу, мг CO<sub>2</sub>/м<sup>2</sup>·год;

$S$  – площа листа пагону, см<sup>2</sup>;

$10000$  – коефіцієнт переведення см<sup>2</sup> у м<sup>2</sup>;

$A_{CO_2}$  – маса вуглекислого газу, який поглинула рослина під час фотосинтезу;

$t$  – час досліду, год.

Для визначення чистого фотосинтезу враховують кількість CO<sub>2</sub>, яка виділяється рослиною у результаті дихання за 30 хв. З цією метою колбу накривають темною тканиною та витримують протягом ще 30 хв, після чого знову вимірюють рН розчину та повторюють обчислення, як у попередньому варіанті досліду.

**Обладнання:** 1) пагін рослини або листок; 2) асиміляційна скляна колба об'ємом 500–700 мл; 3) пробка до колби з вставленою скляною трубкою; 4) термометр; 5) електролампа на 200–300 Вт; 6) темна тканина; 7) піпетка на 3 мл; 8) електронні терези; 9) калька.

**Реактиви:** 1) 0,001 N розчин NaHCO<sub>3</sub>; 2) буферна шкала, 3) індикатор крезоловий червоний.



### **Приготування реактивів**

**Реактив № 1.** 0,001 N розчин бікарбонату натрію  $\text{NaHCO}_3$  – 0,084 г (бікарбонат натрію розчиняють у дистильованій воді та доводять об'єм розчину до 1 л).

**Реактив № 2.** Стандартна шкала для рН 7,0–9,0 – з перекристалізованих компонентів готують наступні розчини:

**a** – 1/20 M (0,05 M) розчин бури (19,108 г  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ );

**b** – 1/5 M (0,2 M) розчин борної кислоти + 1/20 M (0,05 M) розчин  $\text{NaCl}$  (12,45 г  $\text{H}_3\text{BO}_3$  + 2,925 г  $\text{NaCl}$  розчиняють у 1 л  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Розчини змішують у пропорціях, вказаних у табл. 1Д та додають у кожную пробірку 3 краплини індикатору крезолового червоного та кристалик тимолу.

**Реактив № 3.** 0,2 % розчину індикатору кризоловий червоний – розчиняють 0,2 г барвника у 50 мл етилового спирту і доводять до 100 мл дистильованою водою.

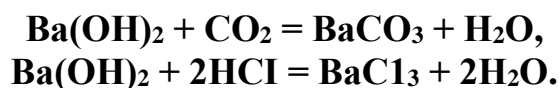
### **Контрольні питання**

1. Який показник називають інтенсивністю фотосинтезу? В яких одиницях він вимірюється?
2. Охарактеризуйте принцип методу визначення інтенсивності фотосинтезу, використаний у цій роботі.
3. Як визначити чистий фотосинтез?
4. Які показники називають видимим та чистим фотосинтезом?

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4.4. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ФОТОСИНТЕЗА МЕТОДОМ АСИМІЛЯЦІЙНОЇ КОЛБИ ЗА Л. А. ІВАНОВИМ ТА Н. Л. КОССОВИЧЕМ**

Метод заснований на визначенні кількості диоксиду вуглецю, який поглинається листям під час фотосинтезу. Пагін або окремих листок приміщують у повернуту догори дном скляну колбу (Рис. 9) та ставлять на світло на певний час. Частина диоксиду вуглецю використовується у процесі фотосинтезу. Далі  $\text{CO}_2$ , який не був поглинутий листям, зв'язують за допомогою надлишку розчину лугу, а залишок лугу титрують соляною або щавлевою кислотою. Так само вчиняють з контрольною колбою (без рослини) та співставляють результати титрування.

Якщо дослідна та контрольна колби мають однаковий об'єм і в обидві колби була налита однакова кількість розчину  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , то кількість диоксиду вуглецю, який поглинула рослина, буде прямо пропорційною різниці результатів титрування вмісту цих колб. Реакції поглинання диоксиду вуглецю та титрування ідуть за наступними рівняннями:



З цих рівнянь витікає, що 1 моль HCl відповідає 0,5 моля CO<sub>2</sub>, або  $44/2 = 22$  г CO<sub>2</sub>.

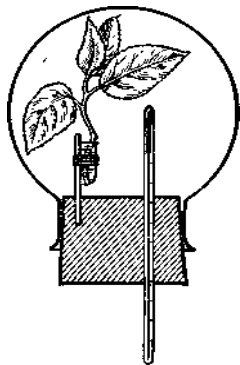


Рис. 9 –  
Асиміляційна  
колба

**Хід роботи.** Взяти дві однакові колби та обгорнути їхні горла папером або серветками. Витримати колби в однакових умовах відкритими протягом 20–30 хв для заповнення повітрям. Вставити у них пробки з отворами, закритими скляними пробками, не допускаючи нагрівання колб від дотику рук.

Зрізати гілку або окремих листок, оновити зріз під водою та поставити в заповнену кип'яченою водою пробірку, прикріплену до палички, вставленої у пробку. Швидко вставити пробку з рослиною у асиміляційну колбу та виставити її на світло. Під час досліду потрібно стежити за температурою у колбі. У випадку її перегріву колбу охолоджують водою.

Тривалість досліду повинна бути такою, щоб листки встигли поглинути не більше 25 % CO<sub>2</sub>, який міститься у колбі (для колб об'ємом 1 л експозиція становить близько 5 хв, для більшого об'єму – 15–20 хв). По закінченні досліду видаляють з колби рослину, закривають колбу і через отвір у пробці приливають 20 мл 0,025 Н розчину Ba(OH)<sub>2</sub> та 2–3 краплі фенолфталеїну. Те ж саме чинять і з контрольною колбою, у яку не приміщувалася рослина. Колби з розчином Ba(OH)<sub>2</sub> збовтують протягом 20 хв для поглинання диоксиду вуглецю. Далі проводять титрування через отвір у пробці 0,025 н. соляною кислотою до зникнення рожевого забарвлення.

Інтенсивність фотосинтезу обчислюють за формулою:

$$I_{\phi} = \frac{(A-B) \cdot K \cdot 0,55 \cdot 60}{S \cdot t},$$

де  $A$  – кількість HCl, витраченої на титрування баріту у дослідній колбі, мл;

$B$  – кількість HCl, витраченої на титрування баріту у контрольній колбі, мл;

$K$  – поправка до титру HCl;

0,55 – число мг CO<sub>2</sub>, яке відповідає 1 мл 0,025 н. HCl;

$S$  – площа листків, дм<sup>2</sup>;

$t$  – експозиція, хв;

60 – коефіцієнт перерахунку хвилин у години.

**Обладнання:** 1) рослини; 2) однакові круглодонні колби об'ємом 1,5–3 л; 3) паперові серветки або аркуші паперу; 4) гумові пробки для

закривання колб; 5) бюретки; 6) електрична лампа 200–300 Вт; 7) кип'ячена вода; 8) технічні терези; 9) гирки; 10) ножиці.

**Реактиви:** 1) 0,025 н. розчин  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ; 2) 0,025 н. розчин  $\text{HCl}$ ; 3) розчин фенолфталеїну.

### **Контрольні питання**

1. Яка різниця між поняттями «продуктивність фотосинтезу» та «інтенсивність фотосинтезу»?
2. У яких одиницях вимірюється інтенсивність фотосинтезу?
3. Які речовини є первинними продуктами фотосинтезу?
4. Які сполуки утворюються у світлових реакціях фотосинтезу, як вони використовуються під час фіксації  $\text{CO}_2$ ?
5. Назвіть недоліки визначення інтенсивності фотосинтезу в замкненому просторі.
6. Які речовини є акцепторами вуглекислоти у рослин?
7. Як відбувається регенерація рибулозо-1,5-бісфосфату в процесі фотосинтезу?
8. Чому відбувається знебарвлення кольорового розчину?

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4.5. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ФОТОСИНТЕЗУ ГАЗОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ У ПОТОЦІ ПОВІТРЯ ЗА Й. О. ЧАТСЬКИМ ТА І. Б. СЛАВІКОМ**

Метод заснований на властивості розчину бікарбонату натрію ( $\text{NaHCO}_3$ ) приходити в рівновагу з  $\text{CO}_2$  повітря. У разі поглинання або віддачі розчином, що містить індикатор крезол, вуглекислого газу змінюється його рН і відповідно забарвлення, яке порівнюють зі спеціально виготовленою за табл. 1Д буферною шкалою. Встановлюють величину рН розчину бікарбонату, а потім за табл. 2Д визначають кількість вуглекислоти в повітрі. Ці дані дають змогу розрахувати інтенсивність фотосинтезу рослин.

Колориметричний метод Й. О. Чатського та І. Б. Славіка дає змогу визначити в потоці повітря інтенсивність фотосинтезу листків інтактної рослини, яка перебуває у відносно стабільних умовах концентрації вуглекислого газу. Схема приладу зображена на Рис. 10. Для визначення фотосинтезу необхідні два прилади: один реєструє кількість вуглекислоти в повітрі, що протягується крізь листок (контроль), а інший – визначає залишок  $\text{CO}_2$  в повітрі після поглинання її частини під час фотосинтезу листком (дослід).

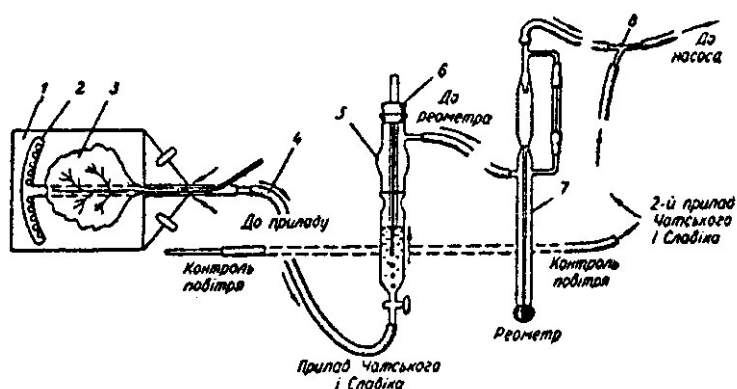


Рис. 10 – Схема приладу для визначення фотосинтезу:

1 – камера з плексигласу для листка; 2 – Т-подібна скляна трубка з отворами; 3 – листок; 4 – гумова трубка; 5 – скляний прилад Чатського і Славіка з індикаторним розчином; 6 – пробка з вставленим в нього термометром; 7 – реометр; 8 – трійник

вається скляним краником. Повітря через краник надходить в індикаторний розчин і проходить крізь нього у вигляді дрібних бульбашок. Виходить повітря з верхньої частини приладу у відповідну трубку і надходить до реометра. За допомогою останнього швидкість течії повітря підтримується сталою протягом всього досліду. Реометр являє собою скляну трубку із запаяним верхнім кінцем, нижня частина її вставляється в підфарбовану рідину, яка міститься в розширеному кінці зовнішньої трубки. Зовнішня трубка приєднується до насоса. Реометр попередньо градууюють за допомогою газового годинника або респіратора. За швидкого потоку повітря зафарбована рідина піднімається по внутрішній трубці, за сповільненої – опускається. Швидкість течії повітря регулюють скляним краником у приладі Чатського–Славіка. Рівень рідини в трубці визначають за шкалою.

Мотор протягує повітря крізь два прилади одночасно. Для цього до трубки, що йде до насоса, через трійник приєднують прилади: контрольний безпосередньо, а дослідний – через реометр. Як камеру використовують поліетиленовий мішечок, в який вставляють Т-подібну скляну трубку та листок; вільні краї мішечка загинають і закріплюють канцелярськими скріпками. Зручнішими є камери-прищепки, виготовлені з плексигласу. Повітря з камери гумовою трубкою надходить до приладу з індикаторним розчином.

**Хід роботи.** Перед дослідом у прилад наливають по 10 мл індикаторного розчину (0,001 Н.  $\text{NaHCO}_3$  + 0,099 Н  $\text{KCl}$ , в який додано чотири краплини крезолового червоного). Вмикають насос і обережно відкривають краники приладів, впускаючи повітря.

Далі за відсутністю змін рН розчину визначають рівновагу між вмістом  $\text{CO}_2$  в повітрі та індикатором у розчині. За допомогою таблиці (табл. 2Д)

## Опис приладу.

Прилад складається з двох скляних частин, з'єднаних між собою шліфом. Висота його 20 см, діаметр нижньої частини 1,5 см. Верхню частину з кулеподібним розширенням і відвідною трубкою закривають гумовою пробкою, крізь яку вставляють термометр у нижню частину з індикаторним розчином. Нижня частина приладу має відтягнутий кінець, який закри-

визначають рН розчинів та знаходять початковий вміст вуглекислого газу в 1 л повітря, беручи до уваги температуру.

До дослідного приладу приєднують камеру з листком і протягують через неї повітря протягом 10–20 хв. Після експозиції закривають обидва краники та вимикають мотор. Після цього вимірюють температуру в приладах і за допомогою буферної шкали встановлюють величину рН у контрольному і дослідному розчинах та обчислюють вміст  $\text{CO}_2$  в повітрі, яке пройшло крізь контрольні та дослідні розчини. Розрахунки інтенсивності фотосинтезу ведуть за формулою:

$$I_{\phi} = \frac{(a-b) \cdot v \cdot 100}{S},$$

де  $a$  – кількість  $\text{CO}_2$  в 1 л повітря, що пройшло через контрольний прилад;

$b$  – кількість  $\text{CO}_2$  в 1 л повітря, що пройшло через дослідний прилад (після поглинання частини  $\text{CO}_2$  в процесі фотосинтезу);

$v$  – швидкість руху повітря крізь індикаторний розчин, л/год;

$S$  – площа листка,  $\text{м}^2$ .

**Обладнання:** 1) рослини; 2) два прилади Чатського–Славіка; 3) термометр; 4) реометр; 5) насос для протягування повітря; 6) Т-подібна скляна трубка з отворами для протягування повітря з камери; 7) поліетиленова або плексигласова камера для листка.

**Реактиви:** 1) 1/20 М розчин 0,001 н.  $\text{NaHCO}_3$  + 0,099 н.  $\text{KCl}$ ; 2) 1/20 М розчин бури ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ); 3) 1,5 М розчин борної кислоти ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ); 4) 1/20 М розчин  $\text{NaCl}$ ; 5) 0,2 %-й крезоловий червоний.

### **Контрольні питання**

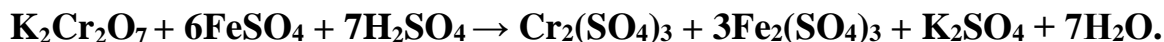
1. Які переваги методу визначення інтенсивності фотосинтезу в потоці повітря порівняно із замкненим простором?
2. Які переваги методу визначення фотосинтезу за Й. О. Чатським і І. Б. Славіком?
3. Якими методами можна визначити площу листків?
4. Чи впливає дихання рослин на величини фотосинтезу?
5. Назвіть апаратуру, що потрібна для використання цього методу.
6. Чи має зазначений метод переваги над інфрачервоним аналізатором, який використовується під час вимірювання інтенсивності фотосинтезу?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4.6. ВИЗНАЧЕННЯ ФОТОСИНТЕЗУ ЗА ЗМІНОЮ ВМІСТУ ВУГЛЕЦЮ В ЛИСТКАХ РОСЛИН

Принцип методу полягає у визначенні органічної речовини перед початком експерименту та після 2–3 год перебування рослини за умов достатнього освітлення. Кількість накопиченого вуглецю органічної речовини знаходять за різницею між його вмістом перед початком та по закінченні досліду, а далі перераховують цей показник на одиницю поверхні листя за одиницю часу. Отриманий результат буде нижчий за дійсну інтенсивність фотосинтезу, оскільки частина синтезованої органічної речовини витрачається на дихання та відтік до інших органів. Для компенсації похибки використовуються контрольні рослини, які перебувають у темряві і в яких визначають зменшення кількості органічної речовини за час досліду. Однак і без визначення цих втрат результати дають досить чітку уяву про хід фотосинтезу. Вуглець органічних речовин визначають за методом І. В. Тюріна, який заснований на мокрому спаленні рослинних тканин у суміші біхромату калію та сірчаної кислоти:



Кількість біхромату калію, який залишився після окислення органічного вуглецю, визначається титруванням розчином солі Мора або сірчаноокислого заліза закисного:



У якості індикатора використовують дифеніламін, відновлена форма якого безбарвна, а за окислення він переходить у сполуку синьо-фіолетового кольору.

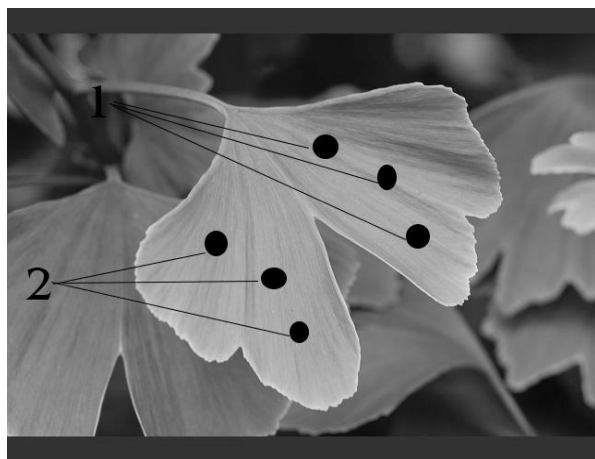


Рис. 11 – Відбір проб для визначення фотосинтезу  
1 – контроль; 2 – дослід

точно 5 хв. Потрібно стежити, щоб кипіння було повільним. Після кип'я-

*Хід роботи.* Вирізають свердлом диски з однієї половини листка рослини, не відділяючи його від гілки (Рис. 11), загальна площа яких складає приблизно 2–3 см<sup>2</sup> (площу потрібно знати точно) і переміщують їх в колбу об'ємом 50 мл, в якій міститься 15 мл 0,4 N розчину біхромату калію (реактив 1). Колбу закривають маленькою лійкою і ставлять на електричну плитку. Для того, щоб рідина в колбі кипіла рівномірно, в неї поміщають декілька скляних капілярів. Рідину в колбі доводять до кипіння і кип'ятять

тіння рідина повинна бути бурого кольору. Якщо колір вмісту колби став зеленим, це вказує на недостатню кількість біхромату калію, який взято для окислення органічної речовини. В цьому випадку потрібно повторити визначення з більшою кількістю розчину біхромату калію. Паралельно кип'ятять контрольний зразок – 15 мл розчину біхромату калію.

Вміст колби охолоджують до кімнатної температури, переливають у колбу для титрування і додають 100 мл води. Для повного перенесення біхромату калію в колбу, в якій проводили кип'ятіння, декілька разів промивають дистильованою водою і зливають промивну воду в колбу для титрування. Загальний об'єм води, який додають до розчину біхромату калію під час промивання, повинен дорівнювати 150 мл. Далі в колбу додають 3 мл 85 % ортофосфорної кислоти та 10 крапель дифеніламіну (реактив 2), вміст колби ретельно збовтують і титрують 0,2 N розчином солі Мора або сірчаноокислого заліза закисного (реактив 3), уважно стежачи за переходом забарвлення розчину. Кінцем титрування є поява зеленого забарвлення від однієї краплі солі Мора або  $\text{FeSO}_4$ . Записують результати контрольного та дослідного титрування.

Після двох або трьох годин освітлення з другої половини листка знову відбирають висічки такої ж площі, як на початку досліду. Зразки спалюють у біхроматі калію і визначають кількість вуглецю, як було описано вище.

Вміст органічного вуглецю в міліграмах на 1  $\text{дм}^2$  листової поверхні обчислюють за формулою:

$$X = \frac{K \cdot (a - b) \cdot 0.6 \cdot 100}{S},$$

де  $a$  – об'єм розчину солі Мора, який використано на титрування контрольного розчину, мл;

$b$  – об'єм розчину солі Мора, який використано на титрування дослідного розчину, мл;

$K$  – поправка до титру солі Мора;

$0,6$  – кількість міліграмів вуглецю, які відповідають 1 мл точно 0,2 N розчину солі Мора;

$S$  – площа висічок,  $\text{см}^2$ .

Для обчислення інтенсивності фотосинтезу знаходять різницю між кількістю органічного вуглецю в дослідному варіанті (після освітлення) та у контролі (до освітлення рослин) та ділять її на термін досліду в годинах.

Інтенсивність фотосинтезу виражають у міліграмах вуглецю, який утворюється 1  $\text{дм}^2$  поверхні за 1 год:

$$I = \frac{X_{\text{досл.}} - X_{\text{контр.}}}{t}.$$

**Обладнання:** 1) дослідні рослини; 2) конічні колби об'ємом 100 та 250 мл; 3) штатив та бюретка для титрування; 4) лійки; 5) піпетки об'ємом

1 та 5 мл; 6) мірні циліндри об'ємом 25 та 250 мл; 7) пробкові свердла діаметром 5–10 мм.

**Реактиви:** 1) 0,4 N розчин біхромату калію ( $K_2Cr_2O_7$ ) в розведений (1:1) сірчаній кислоті ( $H_2SO_4$ ); 2) розчин дифеніламіну; 3) 0,2 N розчин солі Мора  $(NH_4)_2SO_4 \cdot FeSO_4 \cdot 6H_2O$  або сірчаноокислого закисного заліза ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ); 4) 85 % ортофосфорна кислота.

### **Приготування реактивів**

**Реактив № 1.** 0,4 N розчин біхромату калію в розведений сірчаній кислоті: 40 г подрібненого в ступці біхромату калію ( $K_2Cr_2O_7$ ) розчиняють у дистильованій воді, фільтрують через паперовий фільтр в мірну колбу об'ємом 1 л, доводять об'єм розчину до 1 л та переносять розчин у фарфоровий стакан або колбу з термостійкого скла об'ємом 2–2,5 л. До розчину біхромату калію малими порціями дуже обережно додають 1 л концентрованої сірчаної кислоти ( $H_2SO_4$ ) густиною 1,84 і ретельно перемішують. Додавання кислоти для уникнення сильного розігріву рідини та розбрикування кислоти ведуть повільно з інтервалами 10–15 хв. Суміші дають охолонути, ще раз ретельно перемішують та переливають в скляну пляшку.

**Реактив № 2.** Розчин дифеніламіну: 0,5 г дифеніламіну розчиняють у 100 мл концентрованої сірчаної кислоти ( $H_2SO_4$ ) густиною 1,84. До розчину обережно додають 20 мл дистильованої води.

**Реактив № 3.** 0,2 N розчин солі Мора або сірчаноокислого закисного заліза: 80 г солі Мора  $(NH_4)_2SO_4 \cdot FeSO_4 \cdot 6H_2O$  або 27,8 г сірчаноокислого закисного заліза ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) заливають 1 N розчином сірчаної кислоти (20 мл  $H_2SO_4$  густиною 1,84 на 1 л  $H_2O$ ) на 2/3 об'єму у мірній колбі об'ємом 1 л. Розчин перемішують до повного розчинення солі, фільтрують через паперовий фільтр і доводять його об'єм дистильованою водою до 1 л.

Цей розчин дуже швидко псується, тому зберігати його потрібно за спеціальних умов, які перешкоджають проникненню в розчин кисню та інших окисників, які можуть міститися у повітрі. За тривалого зберігання потрібно щоденно перевіряти титр розчину.

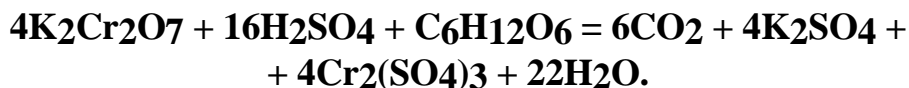
### **Контрольні питання**

1. Які процеси відбуваються під час темної стадії фотосинтезу?
2. Які шляхи фіксації вуглекислого газу рослинами Ви знаєте?
3. Якими методами можна визначити інтенсивність фотосинтезу? Дайте їхню коротку характеристику.
4. Наведіть принцип методу визначення інтенсивності фотосинтезу за накопиченням органічної речовини. Які вади цього методу?
5. Як обчислюється вміст органічної речовини та інтенсивність фотосинтезу?



## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4.7. ФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ФОТОСИНТЕЗУ ЗА НАКОПИЧЕННЯМ ОРГАНІЧНИХ РЕЧОВИН

Під час спалення рослинного матеріалу у хромовій суміші відбувається окислення вуглеводів за наступною схемою:



У результаті цього процесу іони  $\text{Cr}^{+6}$  жовтого кольору відновлюються до іонів  $\text{Cr}^{+3}$  зеленого кольору. Кількість іонів  $\text{Cr}^{+3}$  знаходиться у лінійній залежності від кількості окисленої глюкози.

Аналіз вмісту вуглецю заснований на визначенні змін оптичної густини розчину хромової суміші після спалення в ній рослинного матеріалу. Вимірювання проводять на фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі за довжини хвилі 528–590 нм (жовтий світлофільтр). Для визначення кількості вуглецю у рослинному матеріалі використовують калібрувальний графік.

**Хід роботи.** Відібрати пробу з половинки листка, як у попередній роботі (вміст вуглецю повинен становити 2–4,5 мг). Перенести у пробірку, прилити 10 мл хромової суміші. Отриману реакційну суміш кип'ятять протягом 5 хв. Після повного охолодження розчин з пробірки кількісно переносять у мірну колбу на 50 мл і доводять водою до мітки, перемішують. Оптичну густину хромової суміші визначають за допомогою фотоколориметру або спектрофотометру. В якості контролю використовують чисту хромову суміш, оптичну густину якої вимірюють на фотоколориметрі.

Через 2–3 год визначення вмісту вуглецю повторюють, відбираючи проби з другої половинки листка.

За оптичною густиною чистої хромової суміші ( $D_{\text{контр.}}$ ) та хромової суміші після спалення листків ( $D_{\text{досл.}}$ ) обчислюють кількість органічної речовини у пробі в перерахунку на глюкозу. Попередньо обчислюється коефіцієнт  $K_{\text{гл}}$  за котангенсом кута нахилу калібрувального графіка ( $\text{ctg } \alpha$ ) для отриманої оптичної густини.

$$M_{\text{гл.}} = K_{\text{гл.}} \cdot (D_{\text{досл.}} - D_{\text{контр.}}).$$

Виходячи зі співвідношення атомних (або молекулярних мас), можна перерахувати вміст органічної речовини на вуглець ( $M_{\text{C}}$ ) або вуглекислий газ ( $M_{\text{CO}_2}$ ):

$$M_{\text{C}} = 0.4 \cdot M_{\text{гл.}} = 0.4 \cdot K_{\text{гл.}} \cdot (D_{\text{досл.}} - D_{\text{контр.}}),$$
$$M_{\text{CO}_2} = 1.47 \cdot M_{\text{гл.}} = 1.47 \cdot K_{\text{гл.}} \cdot (D_{\text{досл.}} - D_{\text{контр.}}),$$

де  $M_{\text{гл}}$  – кількість глюкози, яка відповідає вмісту органічної речовини у рослинній пробі, мг;

**0,4** та **1,47** – коефіцієнти перерахунку відповідно на вуглець та диоксид вуглецю.

Далі проводять перерахунок кількості вуглецю та поглинутого вуглекислого газу (мг) на одиницю сирої маси (1 г) або на одиницю площі листка (1 см<sup>2</sup>, 1 дм<sup>2</sup>). Кількість вуглецю органічної речовини (в мг), яка міститься у одиниці площі листка, розраховують за формулою:

$$X = \frac{0.4 \cdot M_{\text{гл.}}}{S}.$$

Для обчислення інтенсивності фотосинтезу розраховують різницю між вмістом вуглецю до витримки рослини на освітленні ( $X_1$ ) та після зняття дослідів ( $X_2$ ), віднесену до часу дослідів:

$$I = \frac{X_2 - X_1}{t},$$

де  $X_1$  – вміст вуглецю до експозиції, мг;

$X_2$  – вміст вуглецю після експозиції, мг;

$T$  – час експозиції, год.

**Побудова калібрувального графіка.** Для визначення кількості вуглецю у рослинному матеріалі будують калібрувальний графік. Для цього в одинадцять пробірок приливають 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 та 1,0 мл стандартного розчину глюкози, 10 мл хромової суміші. Реакційну суміш кип'ячать протягом 5 хв на піщаній бані. Після охолодження розчини з пробірок кількісно переносяться в мірні колби на 50 мл, доводять до мітки водою, перемішують і вимірюють оптичну густину на фотоелектроколориметрі (кювета завтовшки 3 см).

За отриманими точками залежності оптичної густини від кількості глюкози будують калібрувальний графік. За котангенсом кута нахилу калібрувального графіка ( $\text{ctg } \alpha$ ) знаходять коефіцієнт ( $K_{\text{гл}}$ ) для глюкози (він дорівнює котангенсу кута  $\alpha$ ). Цей показник знаходять як відношення  $a/b$ .

**Обладнання:** 1) рослинний матеріал; 2) пробірки на 20 мл; 3) мірні колби на 50 мл; 4) бюретки на 50 мл; 5) піщана баня; 6) фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

**Реактиви:** 1) сульфат міді (CuSO<sub>4</sub>); 2) сірчана кислота (конц.); 3) біхромат калію (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>); 4) глюкоза (х. ч.).

**Приготування розчину біхромату калію.** Для приготування 1 л 0,4 Н розчину біхромату калію (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) наважку (19,614 г) розчиняють в мірній колбі на 1 л приблизно у 500 мл води. В якості каталізатора додають 10 мл 10 % розчину сірчаної кислоти міді (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O), об'єм розчину доводять до мітки водою. Хромову суміш 0,2 Н концентрації, необхідну для

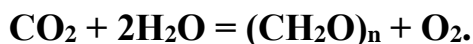
фотоколориметричного визначення вуглецю, отримують розведенням 0,4 розчину  $K_2Cr_2O_7$  концентрованою  $H_2SO_4$  у співвідношенні 1:1.

### **Контрольні питання**

1. Назвіть основні етапи виконання роботи. У яких межах повинна знаходитися кількість органічної речовини у матеріалі?
2. Чим відрізняється запропонований метод визначення інтенсивності фотосинтезу від метода Тюріна?
3. Наведіть методику побудови калібрувального графіка та обчислення результатів дослідів.

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4.8. ВИЗНАЧЕННЯ ПРОДУКЦІЇ ТА ДЕСТРУКЦІЇ ОРГАНІЧНОЇ РЕЧОВИНИ У ВОДНИХ РОСЛИН ЙОДОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ ВІНКЛЕРА**

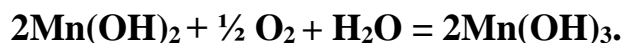
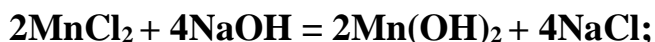
Ідею щодо можливості вимірювання швидкості новоутворення органічної речовини за зміною концентрації кисню в склянках після їхньої експозиції вперше висунув Пюттер в 1908 р. Згодом цей підхід став загальноприйнятим і сьогодні його широко використовують під час визначення продукції макрофітів та фітопланктону. Визначення продукції макрофітів кисневим методом базується на вимірюванні кількості виділеного під час фотосинтезу кисню, яка пов'язана з новоутвореною органічною речовиною прямою залежністю, як це видно із базового рівняння фотосинтезу:



Під час використання цього методу проби досліджуваної води з водними макрофітами в склянках експонують за умов, подібних до природних – «in situ», або за штучного освітлення. Концентрації кисню у воді найчастіше визначають методом Вінклера. Останнім часом широко розповсюдилися також електрохімічні методи визначення кисню у воді.

Йодометричний метод визначення кількості виділеного або поглинутого кисню (метод Вінклера) базується на послідовних хімічних реакціях.

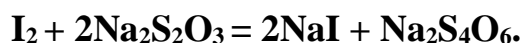
Зв'язування кисню, що міститься в склянці, відбувається шляхом наступних реакцій:



Подальше підкислення при наявності KI призводить до виділення вільного  $I_2$  у кількості, еквівалентній зв'язаному кисню:



Йод, що виділяється, титрують розчином тіосульфату відомої нормальності за присутності крохмалю як індикатора:



Слід зазначити, що йодометричний метод визначення кисню дає відтворювані результати лише під час аналізу порівняно чистих вод, які не містять у великих кількостях нітратів, солей тривалентного заліза, сірководню, а також розчинених органічних сполук. Крім того, за методом Вінклера враховують лише кисень, розчинений у воді. Кисень, який залишається у міжклітинних порожнинах і повітряних каналах водних рослин, не враховують.

**Хід роботи.** Колби з широким горлом на 100 мл з притертими пробками заповнюють відстояною водопровідною водою з постійним вмістом кисню і вносять туди дослідні рослини – некорінені гідатофіти (елодею, наяду, рдест, кушир тощо). Рослини підбирають подібні за зовнішнім виглядом, приблизно однакового розміру, без видимих пошкоджень. Перед зануренням їх в колби, рослини зважують на аналітичних терезах.

Колби закривають таким чином, щоб в них не залишилося пухирців повітря, для цього дають змогу воді деякий час переливатися через край, і експонують їх в оптимальних умовах температури (20–27°C) і освітлення (1800–2000 Лк) для визначення продукції, або в темряві – для визначення деструкції органічної речовини).

Одночасно з дослідними колбами експонують контрольні колби з водою або з досліджуваними рідинами (залежно від схеми досліду), але без рослин. Повторність має бути трикратною. Щоб визначити продукцію, експозиція дорівнює 30–60 хв, для визначення деструкції вона має бути довшою – не менше 120 хв.

Після закінчення експозиції рослини із колб обережно виймають і довгою піпеткою вводять на дно колби по 1 мл 40 %  $\text{MnCl}_2$  і 1 мл 30 %  $\text{NaOH}$  (з додаванням 10 г  $\text{KIO}_3$  на 100 мл розчину), не струшуючи. Піпетку кожний раз занурюють спочатку до половини колби, а потім, у міру того як розчин виливається, піднімають її до верху. Кількість води, яка витискається цими розчинами (2 мл), слід врахувати під час розрахунків вмісту кисню.

Знову ретельно закривають колбу, стежачи, щоб не було пухирців повітря. Розчин енергійно збовтують, перевертаючи колбу, потім протягом 5–10 хв дають відстоятися білому осаді (осад, що утворився, повинен опуститися на дно), після чого додають 2 мл концентрованої  $\text{HCl}$ , закривають і знову сильно струшують до повного розчинення осадку. Розчин буріє від йоду, що звільнюється. Кількість рідини, яка витікає при додаванні кислоти, під час розрахунків не враховують, оскільки кисню в ній уже немає, він весь зафіксований в осаді.

У колби Ерленмейера відбирають 25–30 мл розчину і титрують 0,1 Н розчином тіосульфату натрію майже до знебарвлення. Потім додають

кілька краплин 1 % розчину крохмалю і титрують до зникнення синього забарвлення. З'ясовано, що 1 мл 0,1 Н тіосульфату відповідає 0,8 мг або 0,558 мл кисню за температури 0 °С і тиску 760 мм рт. ст. Результати титрування трьох проб усереднюють.

Концентрації кисню у склянках обчислюють за формулою:

$$X_{O_2} = \frac{0.08 \cdot K \cdot a \cdot 1000}{V},$$

де  $K$  – поправка до титру;

$a$  – кількість тіосульфату, що витратили на титрування проби, мл;

$V$  – об'єм проби, що титрують.

Оскільки титр розчину тіосульфату з часом змінюється, треба вводити поправку ( $K$ ). Для цього в окрему колбу додають 2 мл 10 % KI, 3 мл H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> і 20 мл точно виготовленого розчину 0,02 Н K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>. Через 2–3 хв цю суміш титрують розчином тіосульфату за присутності крохмалю як індикатора. Поправку до титру тіосульфату розраховують за формулою:

$$K = \frac{20}{V},$$

де 20 – об'єм розчину K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>, мл;

$V$  – об'єм розчину тіосульфату, яку витратили на титрування, мл.

Валову ( $P_g$ ) і чисту ( $P_n$ ) продукції а також деструкцію ( $D$ ) розраховують за формулами:

$$P_g = \frac{C_c - C_T}{t},$$

$$P_g = \frac{C_c - C_n}{t},$$

$$P_g = \frac{C_n - C_T}{t},$$

де  $C_n$  – початкова концентрація кисню в склянці;

$C_c$  – кінцева концентрація кисню в світловій склянці після експозиції;

$C_m$  – кінцева концентрація кисню в темновій склянці після експозиції;

$D$  – концентрація кисню в темновій склянці після експозиції;

$T$  – час експозиції, год.

**Обладнання:** 1) водні рослини; 2) колби з широким горлом на 100 мл з притертими пробками; 3) піпетки; 4) бюретка; 5) колби Ейленмейера.

**Реактиви:** 1) розчин  $MnCl_2$ ; 2) розчин  $NaOH + KI$ ; 3) 0,1 Н розчин  $Na_2S_2O_3$ ; 4) концентрована соляна або сірчана кислота; 5) 10%-ий розчин  $KI$ ; 6) 1%-ий розчин крохмалю.

### **Приготування реактивів**

**Реактив № 1.** Розчин  $MnCl_2$ : 40 мг  $MnCl_2$  (або еквівалентну кількість  $MnSO_4$ ) розчиняють в дистильованій воді і доводять об'єм розчину до 100 мл. В разі появи каламуті розчин треба профільтрувати. Сіль марганцю не повинна містити заліза.

**Реактив № 2.** Розчин  $NaOH + KI$ : 33 г  $NaOH$  (або еквівалентну кількість  $KOH$ ) розчиняють у дистильованій воді, додають 20 г  $KI$  і доводять розчин до 100 мл. Якщо розчин мутний, його слід профільтрувати крізь скляний фільтр або скляну вату.

**Реактив № 3.** 0,1 Н розчин  $Na_2S_2O_3$  (тіосульфат натрію): готують з фіксаналу на воді, звільненій від  $CO_2$  кип'ятінням, і зберігають у темній склянці. Для кращого зберігання в розчин додають кілька мл ксилолу або толуолу.

**Реактив № 4.** 1 % розчин крохмалю: 1 г крохмалю розчиняють в кількох мл холодної води і вливають отриманий розчин в 100 мл води, що кипить. Кип'ятять кілька хвилин, доки розчин не стане прозорим.

### **Контрольні питання**

1. Наведіть особливості визначення фотосинтезу у водних рослин. Які показники характеризують цей процес?
2. Як можна визначити концентрацію кисню у воді? Надайте характеристику хімічному методу визначення.
3. Охарактеризуйте поляграфічний метод визначення кисню у водному середовищі. Який з методів точніший і чому?
4. Що таке асиміляція та деструкція? Як визначаються ці показники за методом Вінклера?
5. Для чого обчислюється поправка до титру? Наведіть методику визначення цього показника.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Аеров І. Л. Одночасне визначення вмісту пігментів хлоропластів та міцності зв'язку з білково-ліпоїдним комплексом в листках рослин / І. Л. Аеров, Д. А. Лихолат // Доповіді АН УРСР. – 1966. – № 12. – С. 1599–1601.
2. Аликов Х. К. Фотоколориметрический метод определения содержания углерода в листьях мокрым сжиганием в хромовой смеси / Х. К. Аликов // Методы комплексного изучения фотосинтеза. – Вып. 2. – Л., 1983. – С. 6–14.
3. Баславская С. С. Практикум по физиологии растений / С. С. Баславская, О. М. Трубецкова. – М.: Колос. – 1964. – 243 с.
4. Вознесенский В. Л. Кондуктометрический прибор для измерения фотосинтеза и дыхания растений в полевых условиях / В. Л. Вознесенский. – Л.: Наука, 1969. – 45 с.
5. Вознесенский В. Л. Методы исследования фотосинтеза и дыхания растений / В. Л. Вознесенский, О. В. Заленский, О. А. Семихатова. – М. – Л.: Наука, 1965. – 167 с.
6. Высоочастотный анализатор углекислого газа «Песня-1» для определения интенсивности фотосинтеза и дыхания растений / Сб. «Пути повышения интенсивности и продуктивности фотосинтеза». – К., 1989. – С. 256–259.
7. Гавриленко В. Ф. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание: учеб. пособие / В. Ф. Гавриленко, М. Е. Ладыгина, Л. М. Хандобина. – М.: Высш. шк., 1975. – 391 с.
8. Криницький Г. Т. Лабораторний практикум з курсу «Фізіологія рослин» / Г. Т. Криницький, В. К. Заїка, Р. Т. Гут, Н. Я. Лапка, І. І. Делеган. – Львів, 2011. – 91 с.
9. Методические материалы и задания для проведения лабораторного практикума по курсу «Физиология растений» для студентов 3 курса дневной и 4 курса заочной форм обучения специальности 6.070400 «Биология» образовательного уровня «бакалавр» профессионального направления подготовки 0704 биология / сост.: С. Н. Кабузенко, В. Г. Блохин, С. И. Чмелева, И. П. Отурина. – Симферополь, 2002. – 63 с.
10. Починок Х. Н. Методы биохимического анализа растений / Х. Н. Починок. – К.: Наук. думка, 1976. – 334 с.
11. Практикум по физиологии растений / под ред. проф. И. И. Гунара. – М.: Колос, 1972. – 168 с.
12. Программа и методические указания к выполнению лабораторных работ по спецкурсу «Фотосинтез» (для студентов специальности 2022) / сост.: М. И. Бойко. – Донецк: ДонГУ, 1989. – 31 с.
13. Сальников А. И. Физиология и биохимия растений: практикум / А. И. Сальников, И. Л. Маслов; М-во с.-х. РФ, ФГБОУ ВПО Пермская ГСХА. – Пермь: Изд-во ФГБОУ ВПО Пермская ГСХА, 2014. – 300 с.

14. Третьяков Н. Н. Практикум по физиологии растений / Н. Н. Третьяков, Т. В. Карнаухова, Л. А. Паничкин. – М.: Агропромиздат, 1990. – С. 109–113.

15. Физиологические и биохимические методы анализа растений: практикум / авт.-сост. Г. Н. Чупахина. – Калининград: Калинингр. ун-т, 2000. – 59 с.

16. Фізіологія рослин. Навчально-методичний посібник до виконання лабораторних занять студентами аграрних вузів III–IV рівня акредитації з напряму підготовки 0514 – «Біотехнологія» / укл. О. А. Бойко. – К., 2013. – 47 с.

17. Фізіологія рослин: практикум / О. В. Войцехівська, А. В. Капустян, О. І. Косик та ін.; за заг. ред. Т. В. Паршикової. – Луцьк: Терен, 2010. – 420 с.

18. Циткович И. К. Курс аналитической химии: учебник для сельхоз. вузов / И. К. Циткович. – М.: Высш. шк., 1985. – 40 с.



## ДОДАТОК

**Таблиця 1Д. Приготування стандартних буферних розчинів із рН 7,5–8,8 для порівняльної шкали**

рН	Кількість розчину, мл		рН	Кількість розчину, мл		рН	Кількість розчину, мл	
	а	б		а	б		а	б
7,0	0,45	9,55	7,7	1,75	8,25	8,4	4,45	5,55
7,1	0,60	9,40	7,8	2,05	7,95	8,5	4,95	5,05
7,2	0,75	9,25	7,9	2,35	7,65	8,6	5,50	4,50
7,3	0,95	9,10	8,0	2,70	7,30	8,7	6,05	3,95
7,4	1,10	8,90	8,1	3,05	6,95	8,8	6,70	3,30
7,5	1,30	8,70	8,2	3,50	6,50	8,9	7,40	2,60
7,6	1,50	8,50	8,3	3,95	6,05	9,0	8,20	1,80

*Примітка: а – 1/20 М розчин бури (19,108 г Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O в 1 л дистильованої води без CO<sub>2</sub>); б – 1/5 М розчин борної кислоти + 1/20 М NaCl (12,45 г H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> + 2,925 г NaCl в 1 л води). Індикатор – крезоловий червоний.*

**Таблиця 2Д. Залежність вмісту CO<sub>2</sub> в 0,001Н NaHCO<sub>3</sub> розчині від температури та рН (мг CO<sub>2</sub> на л)**

рН	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°	17°	18°	19°	20°
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
7,20	2,69	2,73	2,77	2,80	2,84	2,89	2,93	2,97	3,01	3,05	3,09	3,13	3,17	3,22	3,28	3,33
7,25	2,38	2,42	2,46	2,50	2,53	2,56	2,60	2,63	2,68	2,70	2,73	2,75	2,80	2,85	2,90	2,95
7,30	2,11	2,14	2,17	2,20	2,23	2,27	2,30	2,33	2,37	2,40	2,43	2,46	2,49	2,52	2,55	2,60
7,35	1,86	1,89	1,92	1,95	1,98	2,01	2,04	2,07	2,10	2,12	2,15	2,18	2,20	2,23	2,27	2,31
7,40	1,65	1,68	1,70	1,73	1,75	1,78	1,80	1,83	1,86	1,88	1,90	1,92	1,95	1,98	2,02	2,05
7,45	1,46	1,48	1,50	1,53	1,55	1,58	1,60	1,62	1,65	1,67	1,69	1,71	1,73	1,75	1,78	1,81
7,50	1,29	1,31	1,33	1,35	1,37	1,40	1,42	1,44	1,46	1,48	1,50	1,52	1,54	1,56	1,58	1,60

pH	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°	17°	18°	19°	20°
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
7,55	1,14	1,16	1,18	1,20	1,22	1,24	1,25	1,27	1,28	1,30	1,32	1,33	1,35	1,37	1,40	1,42
7,60	1,01	1,03	1,04	1,06	1,08	1,10	1,12	1,13	1,14	1,16	1,17	1,18	1,20	1,22	1,24	1,26
7,65	0,89	0,91	0,92	0,94	0,95	0,96	0,98	0,99	1,00	1,02	1,03	1,05	1,06	1,08	1,10	1,12
7,70	0,79	0,80	0,81	0,82	0,84	0,85	0,86	0,88	0,89	0,90	0,91	0,92	0,94	0,95	0,97	0,98
7,75	0,70	0,71	0,72	0,73	0,74	0,75	0,76	0,77	0,79	0,80	0,81	0,82	0,83	0,84	0,86	0,87
7,80	0,61	0,62	0,63	0,64	0,65	0,66	0,67	0,68	0,69	0,70	0,71	0,72	0,73	0,75	0,76	0,77
7,85	0,54	0,55	0,56	0,57	0,58	0,59	0,60	0,60	0,61	0,62	0,63	0,64	0,65	0,66	0,67	0,68
7,90	0,48	0,49	0,49	0,50	0,51	0,52	0,53	0,53	0,54	0,55	0,56	0,56	0,57	0,58	0,59	0,60
7,95	0,42	0,43	0,44	0,44	0,45	0,46	0,47	0,48	0,48	0,49	0,50	0,51	0,51	0,52	0,52	0,53
8,00	0,38	0,38	0,39	0,39	0,40	0,41	0,41	0,42	0,43	0,43	0,44	0,44	0,45	0,45	0,46	0,46
8,05	0,33	0,34	0,34	0,35	0,35	0,36	0,36	0,37	0,37	0,37	0,38	0,38	0,39	0,39	0,40	0,40
8,10	0,29	0,30	0,30	0,31	0,31	0,32	0,32	0,33	0,34	0,34	0,35	0,35	0,36	0,36	0,37	0,37
8,15	0,26	0,26	0,27	0,27	0,28	0,28	0,29	0,29	0,30	0,30	0,31	0,31	0,32	0,32	0,33	0,33
8,20	0,23	0,23	0,24	0,24	0,24	0,25	0,25	0,26	0,26	0,26	0,27	0,27	0,27	0,28	0,28	0,29
8,25	0,20	0,21	0,21	0,21	0,22	0,22	0,22	0,23	0,23	0,23	0,24	0,24	0,24	0,25	0,25	0,25
8,30	0,18	0,18	0,19	0,19	0,19	0,20	0,20	0,20	0,20	0,21	0,21	0,21	0,21	0,22	0,22	0,22
8,35	0,16	0,16	0,16	0,17	0,17	0,17	0,17	0,18	0,18	0,18	0,19	0,19	0,19	0,19	0,20	0,20
8,40	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,17	0,17	0,17	0,17	0,18
8,45	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
8,50	0,11	0,11	0,11	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,14	0,14

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
ПРОГРАМА СПЕЦКУРСУ «ФОТОСИНТЕЗ» .....	4
<b>Змістовий модуль 1. Фототрофна функція рослин.</b> Будова фотосинтетичного апарату .....	4
<b>Змістовий модуль 2. Світлова стадія фотосинтезу .....</b>	4
<b>Змістовий модуль 3. Темнова стадія фотосинтезу.....</b>	5
<b>Змістовий модуль 4. Продукти фотосинтезу та їхнє використання.</b> Регуляція фотосинтезу .....	5
<b>1. ПРИНЦИПИ МЕТОДІВ .....</b>	<b>6</b>
<b>Фотометрія.....</b>	<b>6</b>
<b>Хроматографія .....</b>	<b>13</b>
<b>Кондуктометричні методи аналізу .....</b>	<b>16</b>
<b>Інфрачервоний газоаналіз.....</b>	<b>18</b>
<b>2. АНАЛІЗ ПІГМЕНТНОГО КОМПЛЕКСУ РОСЛИН .....</b>	<b>20</b>
<b>Лабораторна робота 2.1. Кількісне визначення зелених пігментів</b> спектрофотометричним методом.....	20
<b>Лабораторна робота 2.2. Розділення та кількісне визначення</b> пігментів рослин методом хроматографії на папері (за Д. І. Сапожніковим).....	22
<b>Лабораторна робота 2.3. Вивчення спектрів поглинання</b> зелених пігментів.....	26
<b>Лабораторна робота 2.4. Дослідження спектрів поглинання</b> жовтих пігментів .....	28
<b>Лабораторна робота 2.5. Виділення та кількісне визначення</b> протохлорофілу з використанням полярних та неполярних розчинників.....	29
<b>Лабораторна робота 2.6. Визначення міцності зв'язку хлорофілу</b> з білками (за І. Л. Аєровим та Д. А. Лихолатом).....	31
<b>Лабораторна робота 2.7. Визначення активності хлорофілази.....</b>	<b>33</b>
<b>3. СВІТЛОВА СТАДІЯ ФОТОСИНТЕЗУ.....</b>	<b>36</b>
<b>Лабораторна робота 3.1. Отримання суспензії ізольованих</b> хлоропластів з листя рослин .....	36
<b>Лабораторна робота 3.2. Спектрофотометричний метод</b> визначення фотохімічної активності хлоропластів за швидкістю відновлення 2,6-дихлорфеноліндофенолу (ДХФІФ) .....	37
<b>Лабораторна робота 3.3. Дія інгібіторів на швидкість</b> фотовідновлення акцепторів в реакції Хілла.....	39

Лабораторна робота 3.4. Вплив роз'єднувальних фотофосфорилування агентів на швидкість відновлення акцепторів в реакції Хілла.....	40
4. ТЕМНОВА СТАДІЯ ФОТОСИНТЕЗУ .....	42
Лабораторна робота 4.1. Визначення інтенсивності фотосинтезу за допомогою інфрачервоного газоаналізатора .....	42
Лабораторна робота 4.2. Визначення інтенсивності фотосинтезу за поглинанням CO <sub>2</sub> у потоці повітря кондуктометричним методом .....	44
Лабораторна робота 4.3. Визначення інтенсивності фотосинтезу за методом Олвіка–Целлера .....	46
Лабораторна робота 4.4. Визначення інтенсивності фотосинтезу методом асиміляційної колби за Л. А. Івановим та Н. Л. Коссовичем .....	48
Лабораторна робота 4.5. Визначення інтенсивності фотосинтезу газометричним методом у потоці повітря за Й. О. Чатським та І. Б. Славіком .....	50
Лабораторна робота 4.6. Визначення фотосинтезу за зміною вмісту вуглецю в листках рослин .....	53
Лабораторна робота 4.7. Фотометричне визначення інтенсивності фотосинтезу за накопиченням органічних речовин .....	56
Лабораторна робота 4.8. Визначення продукції та деструкції органічної речовини у водних рослин йодометричним методом Вінклера.....	58
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	62
ДОДАТКИ.....	64

Навчальне видання

**Приседський Юрій Георгівич**

**ФОТОСИНТЕЗ  
МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК  
З ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ  
ТА САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ**

Редактор А. О. Цяпало

Технічний редактор Т. О. Важеніна

Підписано до друку 01.03.2016  
Формат 60 x 84/16. Папір офсетний.  
Друк – цифровий. Умовн. друк. арк. 3,9  
Тираж 50 прим. Зам. 5

Донецький національний університет (Вінниця)  
21021, м. Вінниця, 600-річчя, 21  
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи  
до Державного реєстру  
серія ДК № 1854 від 24.06.2004