

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Лабораторный практикум
для студентов
биологического факультета

МИНСК
БГУ
2011

УДК 581.1(076)(075.8)
ББК 28.57я73
Ф50

А в т о р ы:
А. П. Кудряшов, Т. И. Дитченко, О. В. Молчан,
И. И. Смолич, О. Г. Яковец

Рекомендовано
ученым советом
биологического факультета
16 июня 2009 г., протокол № 10

Р е ц е н з е н т ы:
доктор биологических наук *В. В. Карпук*;
кандидат биологических наук *Т. А. Будкевич*

Ф50 **Физиология растений** : лабораторный практикум для студентов биологического факультета [Электронный ресурс] / А. П. Кудряшов [и др.]. – Минск : БГУ, 2011. – Режим доступа : <http://www.elib.bsu.by>, ограниченный.
ISBN 978-985-518-501-8.

Лабораторный практикум «Физиология растений» предназначен для закрепления теоретического материала, приобретения навыков практической работы и ознакомления с основными методами исследований физиологических процессов растений, в нем представлены 22 лабораторные работы по курсу «Физиология растений», приведены методические рекомендации, теоретическое описание.

Предназначено для студентов биологического факультета БГУ, обучающихся по специальностям «Биология» и «Биоэкология».

УДК 581.1(076)(075.8)
ББК 28.57я73

ISBN 978-985-518-501-8

© БГУ, 2011

ПИГМЕНТЫ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ

Пигментами называются вещества, избирательно поглощающие свет в видимой части солнечного света. При освещении их белым светом проявляется окраска, которая как раз и определяется теми длинами волн, что поглощаются веществом.

Молекулы всех органических пигментов содержат систему правильно чередующихся двойных и одинарных (сопряженных) связей. Подобные структуры есть, например, в молекулах каротиноидов и хлорофиллов. При изображении структурных формул связи между атомами принято обозначать линиями, каждой такой линии соответствует пара электронов. При каждом атоме углерода имеется 8 валентных электронов, общих для данного атома и соседних. Таким образом, между каждой парой атомов углерода находится пара электронов, образующих локализованную σ -связь. Кроме того, еще пара π -электронов может перемещаться по всей углеродной цепи (так называемый резонанс). Высокомобильные спаренные электроны, связанные со всей системой сопряженных двойных связей, а не с отдельными атомами, легко возбуждаются квантами света видимой и ближней ультрафиолетовой части спектра.

Благодаря пигментам фотосинтетического аппарата растений становится возможным поглощение энергии света и преобразование ее в энергию химических реакций.

Пигменты фотосинтетического аппарата принято делить на две группы: основные и вспомогательные.

Функциональное назначение основных пигментов – поглощение квантов света (или энергии возбужденных пигментов, основных и вспомогательных) и осуществление фотохимических реакций.

Вспомогательные пигменты расширяют область спектра поглощения видимого света фотосинтетическим аппаратом и защищают основные пигменты от перекисных радикалов, образующихся в ходе световой стадии фотосинтеза.

ИЗВЛЕЧЕНИЕ ПИГМЕНТОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

В нативном растительном материале фотосинтетические пигменты находятся в составе пигмент-белковых комплексов и комплексов с липидами и сосредоточены в хлоропластах. Существует множество методов выделения пигментов из растительной клетки. Предлагаемые при выполнении лабораторных работ способы выделения пигментов подразумевают разрушение нативных форм пигментного аппарата и получение растворов пигментов в органических растворителях. При получении вытяжки пигментов фотосинтетического аппарата используются процедуры гомогенизации тканей и последующие обработки гомогената органическими растворителями. Удачный подбор системы растворителей (полярных и неполярных) позволяет практически полностью выделить пигменты, переведя их в раствор.

Лабораторная работа 1

ПОЛУЧЕНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ ИЗ РАСТЕНИЙ

Вводные замечания

Пигменты определенным образом встроены в мембраны тилакоидов. При получении вытяжки пигментов из фотосинтетического аппарата растений происходит разрушение пигмент-белковых комплексов, а свободные пигменты растворяются в органических растворителях.

Процедура извлечения пигментов фотосинтетического аппарата состоит в механическом разрушении клеточных структур (гомогенизация тканей растений), например, путем растирания их с кварцевым песком и использования органических растворителей, хорошо отделяющих пигменты от их липопротеинового носителя. При этом следует соблюдать меры предосторожности. Для предотвращения фотохимической деструкции процесс выделения производится в затененном помещении, а для снижения активностей ионов H^+ и гидролитических ферментов, выделяющихся из вакуолей, в среду выделения добавляются буферы или немного мела.

Материалы и оборудование

Листья растений; ацетон; этиловый спирт; кварцевый песок; фарфоровая ступка с пестиком; мел; фильтр Шотта (№ 3 или № 4); колба Бунзена; насос Камовского; пробирки (3 шт.); колбы; стаканы химические; цилиндры мерные; шпатель; бумага фильтровальная.

Ход работы

Взвесьте 0,5–1 г растительного материала. Измельченный растительный материал поместите в ступку и добавьте туда немного мела, кварцевого песка и 3–4 мл ацетона или этанола. Разотрите смесь, а гомогенат поместите в воронку фильтра Шотта, соединенную с колбой Бунзена и насосом Камовского. Добавьте туда же еще 4–5 мл растворителя (ацетона или этанола). Произведите фильтрацию гомогената до полного осушения.

Осушенный гомогенат перенесите в ступку, добавьте немного растворителя, снова разотрите и отфильтруйте, как описано выше. Процедуру повторите несколько раз до полного извлечения пигментов. В этом случае растворитель, стекающий в колбу Бунзена, будет бесцветным.

Полученная таким образом вытяжка содержит хлорофиллы и каротиноиды и будет использована для выполнения дальнейших лабораторных работ.

Задание

Определите объем вытяжки. Рассмотрите вытяжку на свету, а также с помощью спектроскопа. Сделайте заключение о ее цвете и особенностях изменения спектра осветителя. Результаты занесите в таблицу.

Таблица записи результатов

Масса растительного материала, г	Объем вытяжки, мл	Цвет вытяжки	Особенности спектра

Контрольные вопросы

1. Для чего производится гомогенизация растительного материала при извлечении пигментов?
2. Какие пигменты фотосинтетического аппарата считаются вспомогательными?
3. Почему для извлечения пигментов фотосинтетического аппарата используются слабополярные растворители?

Лабораторная работа 2

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫТЯЖКИ КАРОТИНА

Вводные замечания

Каротиноиды в растениях распространены достаточно широко и входят в состав не только фотосинтетического аппарата: они придают плодам, органам и тканям растений желто-оранжевый или красный цвет. Само название пигмента «каротин» происходит от латинского *carota* – «морковь», из нее каротин впервые был выделен.

В растениях встречаются как каротин, так и его окисленные формы (ксантофиллы). Кроме того, часто плоды и ткани растений содержат предшественников (т. е. продукты неполного биосинтеза пигмента) каротина.

Материалы и оборудование

Корнеплоды моркови; петролейный эфир; фильтр Шотта (№ 3 или № 4); колба Бунзена; насос Камовского; колба стеклянная вместимостью 0,25 л; нож; марля; колба; стакан химический; цилиндр мерный.

Ход работы

Взвесьте 25 г очищенных корнеплодов моркови. Мелко нарежьте их ножом и поместите в стеклянную колбу. Добавьте в эту же колбу 30–40 мл петролейного эфира, сильно встряхните смесь и оставьте в темном месте на несколько суток. Отфильтруйте вытяжку сначала через слой марли, а затем через фильтр Шотта.

Задание

Определите объем вытяжки. Рассмотрите вытяжку на свету, а также с помощью спектроскопа. Сделайте заключение о ее цвете и особенностях спектра поглощения. Результаты занесите в таблицу.

Таблица записи результатов

Масса растительного материала, г	Объем вытяжки, мл	Цвет вытяжки	Особенности спектра

Контрольные вопросы

1. Для чего нужны вспомогательные пигменты в фотосинтетическом аппарате растений?
2. Какие формы каротиноидов встречаются в растениях?
3. Почему для извлечения каротина используется неполярный растворитель?

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ

Все фотосинтезирующие организмы содержат пигменты, способные поглощать видимый свет, запуская тем самым химические реакции фотосинтеза. Пигменты пластид относятся к трем классам веществ: хлорофиллам, каротиноидам и фикобилинам.

Хлорофиллы (зеленые пигменты). В твердом виде хлорофилл *a* представляет собой аморфное вещество сине-черного цвета. Температура плавления хлорофилла *a* 117–120 °С. Хлорофиллы хорошо растворимы в этиловом эфире, бензоле, хлороформе, ацетоне, этиловом спирте, пиридине, плохо растворимы в петролейном эфире и нерастворимы в воде. Раствор хлорофилла *a* в этиловом эфире имеет сине-зеленый цвет, хлорофилла *b* – желто-зеленый.

Элементарный химический состав хлорофилла *a* ($C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$) и хлорофилла *b* ($C_{55}H_{70}N_4O_6Mg$) определен Р. Вильштеттером в 1914 г. Хлорофилл представляет собой сложный эфир дикарбоновой кислоты хлорофиллина, у которой одна карбоксильная группа этерифицирована остатком метилового спирта, а вторая – остатком спирта-фитола (рис. 1).

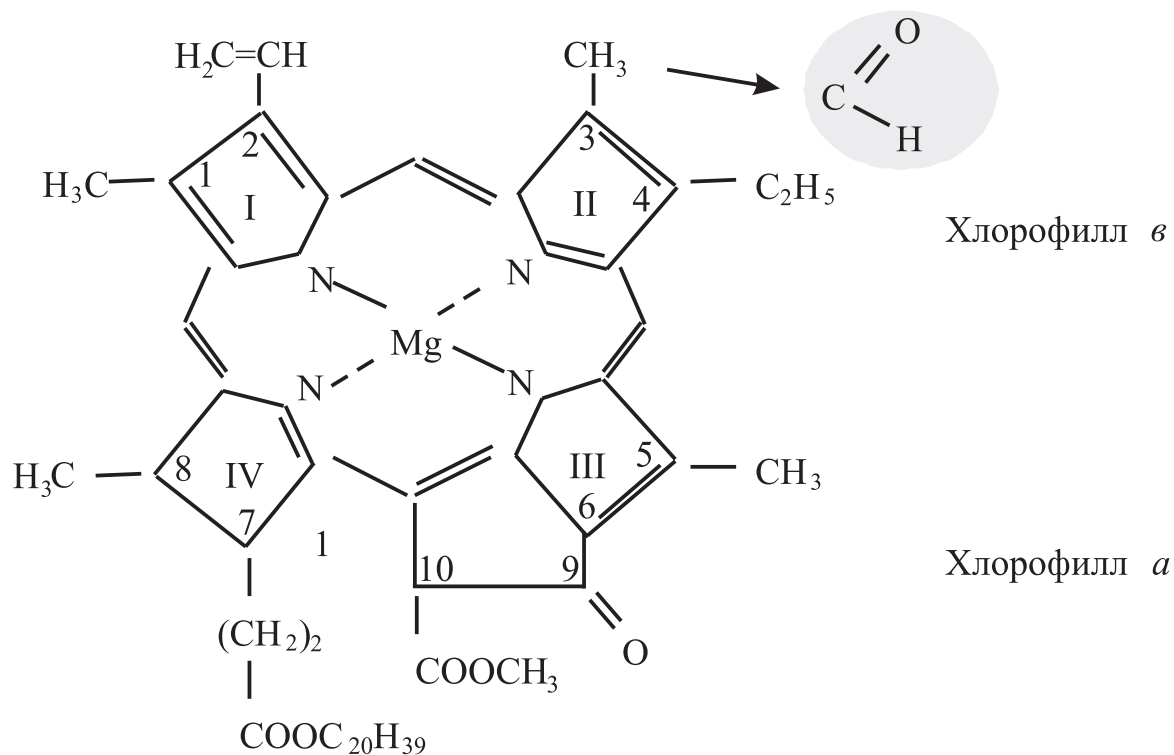


Рис. 1. Структурная формула хлорофилла *a*

Молекулярная масса хлорофилла *a* составляет 893, хлорофилла *b* – 907. Молекула хлорофилла состоит из порфириновой «головки» и фитольного «хвоста». Четыре пиррольных кольца соединены между собой метиновыми мостиками, формируя порфириновое ядро. Атомы азота пиррольных колец соединяются двумя координационными связями с атомом Mg. В структуре порфиринового ядра имеется также циклопентановое кольцо, в котором содержится обладающая большой реакционной способностью кетогруппа. В результате энолизации по месту этой кетогруппы к молекуле хлорофилла присоединяется вода. Хлорофилл *b* отличается от хлорофилла *a* наличием у C₃-углеродного атома во II кольце альдегидной группы вместо метильной. При разрыве сложноэфирной связи и отщеплении фитола образуется соединение, называемой хлорофиллидом. Если в молекуле хлорофилла атом Mg замещен на два атома водорода, образуется соединение бурого цвета – феофитин. В естественных условиях образование феофитина происходит при старении листьев; осенью, под влиянием неблагоприятных факторов листья желтеют. В природе появление феофитина вызвано увеличением проницаемости мембран и проникновением в хлоропласт кислого клеточного сока.

Для функционирования молекулы хлорофилла в процессах фотосинтеза существенное значение имеет ее пространственная организация. Расстояние между атомами азота пиррольных группировок в ядре хлорофилла составляет 0,25 нм. Диаметр атома Mg равен 0,24 нм. Таким образом, магний почти полностью заполняет пространство между атомами азота пиррольных группировок. Это придает ядру молекулы хлорофилла дополнительную прочность. Магний-порфириновое кольцо представляет собой почти плоскую пластинку толщиной 0,42 нм и площадью 1 нм². Это гидрофильная часть молекулы. Длинный алифатический остаток фитола (2 нм), образующий угол с порфириновым кольцом, – ее гидрофобный полюс. Полярность молекулы хлорофилла обуславливает определенное расположение ее в мембранах хлоропластов. Порфириновая часть молекулы находится на поверхности мембраны тилакоида и связана с белками, а фитольная цепь погружена в липидный слой. В листе хлорофилл находится в комплексном соединении с белком (на 1 молекулу белка приходится 3–10 молекул хлорофилла). Вместе с тем хлорофилл может взаимодействовать и с липидами мембран. Важным свойством молекул хлорофилла является их способность к взаимодействию друг с другом. В настоящее время показано, что хлорофилл в мембра-

нах пластид находится в виде пигмент-липопротеидных комплексов с различной степенью агрегации.

Хлорофилл в живой интактной клетке обладает способностью к обратимому фотоокислению и фотовосстановлению (способен к окислительно-восстановительному превращению). Это связано с наличием в молекуле хлорофилла сопряженных двойных связей с подвижными π -электронами и атомов азота с неподеленными электронами. Азот пиррольных ядер может окисляться (отдавать электрон) или восстанавливаться (присоединять электрон). Таким образом, хлорофилл является хорошим оптическим сенсбилизатором: легко возбуждается при поглощении света и обладает способностью передавать энергию (служить донором энергии) другим молекулам (акцепторам энергии). Передача энергии возможна лишь при условии, что спектр флуоресценции пигмента-донора перекрывается со спектром поглощения пигмента-акцептора. Таким путем происходит резонансная передача энергии в хлоропластах от светособирающего комплекса к реакционному центру возбуждения пигментами от молекулы донора к молекуле акцептора.

Каротиноиды (желтые или оранжевые пигменты). Все каротиноиды – полиеновые соединения. Они образуют 40-углеродную цепь, построенную из 8 остатков изопрена. Каротиноиды подразделяются на каротины – ненасыщенные углеводороды оранжевого или красного цвета – и ксантофиллы – желтые пигменты, содержащие в своей структуре кислород. Основными представителями каротиноидов у высших растений являются β -каротин (оранжевый) – $C_{40}H_{56}$ – и ксантофилл (желтый) – $C_{40}H_{56}O_2$. Каротиноиды могут быть ациклическими (алифатическими), моно- и бициклическими. Циклы на концах молекул каротиноидов являются производными иона. Подобно хлорофиллу каротиноиды в хлоропластах нековалентно связаны с белками и липидами фотосинтетических мембран.

Каротиноиды играют роль вспомогательных светособирающих пигментов в той части солнечного спектра (450–570 нм), где слабо поглощает хлорофилл. В отличие от хлорофиллов каротиноиды не поглощают красные лучи и не обладают способностью к флуоресценции. Спектры поглощения каротиноидов характеризуются наличием трех полос в фиолетово-синей и синей областях от 400 до 500 нм. Количество и положение максимумов поглощения зависят от растворителя. Поглощение света каротиноидами, их окраска, а также способность к окислительно-восстановительным реакциям обусловлены наличием конъюгированных двойных связей. При увеличении числа таких связей максимумы поглощения смещаются в длинноволновую область спектра.

Лабораторная работа 3

РАЗДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ ПО МЕТОДУ КРАУСА

Вводные замечания

Метод основан на различной растворимости пигментов в органических растворителях (спирте и петролейном эфире). Сродство пигментов к полярным (ацетон, спирт) и неполярным (петролейный эфир) растворителям определяется степенью их полярности. Ксантофиллы, содержащие две и более полярных групп, хорошо растворимы в спирте, в то время как каротин отличается более высоким сродством к петролейному эфиру. Фитольный остаток в молекуле хлорофилла представляет ее гидрофобную часть и обеспечивает способность молекул пигментов растворяться в петролейном эфире. Удаление фитола при омылении хлорофилла увеличивает сродство пигмента к полярным растворителям.

Материалы и оборудование

Спиртовая вытяжка пигментов из растительного материала, пробирки с пробками; штатив для пробирок; пипетки; петролейный эфир или бензин; вода дистиллированная; спектроскоп или спектрофотометр.

Ход работы

В пробирку налейте 3–4 мл спиртовой вытяжки смеси пигментов, 6–8 мл петролейного эфира или бензина и 2–3 капли воды для того, чтобы спиртовая фаза не смешивалась с петролейно-эфирной (бензиновой). Пробирку закройте, несколько раз сильно встряхните и дайте отстояться 2–3 мин. Происходит разделение слоев: бензин или петролейный эфир как более легкие будут вверху, а спирт – внизу. Верхний зеленый слой (петролейно-эфирный или бензиновый) содержит оба зеленых пигмента и каротин, которые лучше растворяются в петролейном эфире, чем в разбавленном водой спирте. Нижний желтый слой (водно-спиртовой) содержит ксантофиллы. Если разделение пигментов будет недостаточно четким (оба слоя окрашены в зеленый цвет), то добавьте еще 1–2 капли воды и продолжите взбалтывание. Помутнение нижнего слоя (от избытка воды) можно устранить, добавив немного спирта.

Задание

Разделите пигменты на две фракции. Определите спектр поглощения хлорофилла. Показателем чистоты отделения хлорофилла от зеленых пигментов является отсутствие поглощения в красной области спектра. Оставьте содержимое пробирки для выполнения последующих лабораторных работ.

Оформите работу, указав цель работы, объект исследования; опишите ход работы, полученные результаты и сделайте выводы. Результаты занесите в таблицу.

Таблица записи результатов

Слой	Цвет	Состав пигментов	Спектр поглощения	Примечание

Контрольные вопросы

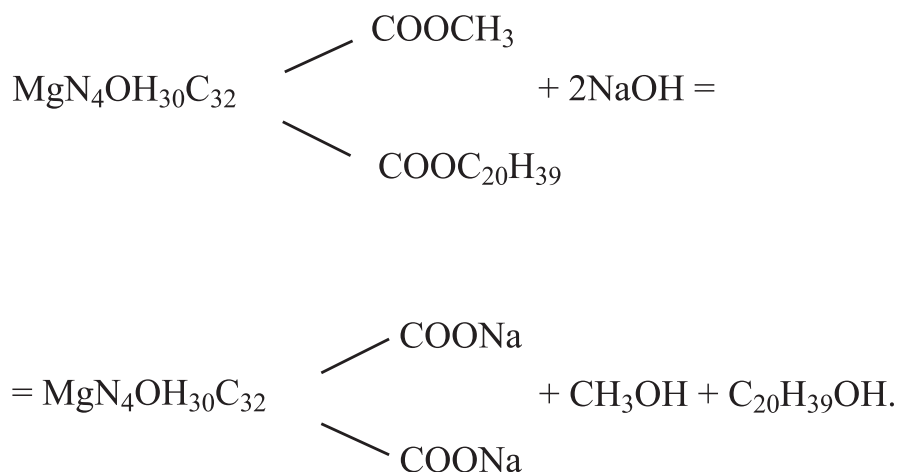
1. На чем основано разделение пигментов по методу Крауса?
2. Какие пигменты находятся в петролейно-эфирном слое?
3. Какие пигменты находятся в водно-спиртовом слое?
4. Что является показателем чистоты отделения хлорофилла от зеленых пигментов?

Лабораторная работа 4

ОМЫЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА ЩЕЛОЧЬЮ И ОТДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА

Вводные замечания

Хлорофилл представляет собой двойной сложный эфир магниевой соли дикарбоновой хлорофиллиновой кислоты и двух спиртов – метанола и фитола. Под действием щелочи (KOH или NaOH) происходит омыление хлорофилла, которое заключается в разрыве сложноэфирных связей, отщеплении спиртов (метанола и фитола), образовании двойной калиевой или натриевой соли дикарбоновой хлорофиллиновой кислоты. Реакция хлорофилла со щелочью идет следующим образом:



Образующаяся при этом соль хлорофиллиновой кислоты сохраняет зеленую окраску и оптические свойства хлорофилла, но отличается от него большей гидрофильностью.

Материалы и оборудование

Спиртовая вытяжка пигментов из растительного материала, пробирка, содержащая пигменты, разделенные по методу Крауса (лабораторная работа 2); пробирки с пробками; штатив для пробирок; пипетки; петролейный эфир или бензин; 20 % спиртовой раствор щелочи (NaOH или KOH); NaOH или KOH; вода дистиллированная; спектроскоп или спектрофотометр.

Ход работы

Вариант 1. В пробирку с 2–3 мл спиртовой вытяжки пигментов прибавьте 1 мл 20 % раствора NaOH или KOH, 1–1,5 мл петролейного эфира или бензина и 2 капли дистиллированной воды, закройте пробкой, тщательно перемешайте, встряхивая пробирку, дайте отстояться. Нижний (водно-спиртовой) слой содержит соль хлорофиллиновой кислоты (продукт омыления хлорофилла) и ксантофилл. Верхний (петролейно-эфирный или бензиновый) слой содержит каротин. Определите спектр поглощения каротина.

Вариант 2. В пробирку, где проведено разделение по методу Крауса (лабораторная работа 2), прибавьте кусочек (0,2–0,5 г) NaOH или KOH, закройте пробирку пробкой, тщательно перемешайте, после чего дайте отстояться. Произойдет омыление хлорофилла, в результате чего омыленный хлорофилл теряет способность растворяться в петролейном эфире (бензине) и перемещается в нижний (водно-спиртовой) слой. Будет наблюдаться следующее

размещение слоев: сверху будет желтый, содержащий каротин; внизу – зеленый (водно-спиртовой), содержащий продукты омыления хлорофилла щелочью и ксантофилл. Определите спектр поглощения каротина.

Задание

Проведите омыление хлорофилла по двум вариантам, сравните полученные результаты.

Оформите работу, указав ее цель, объект исследования; опишите ход работы, полученные результаты и сделайте выводы. Результаты занесите в таблицу.

Таблица записи результатов

Слой	Цвет	Состав пигментов	Спектр поглощения	Примечание

Контрольные вопросы

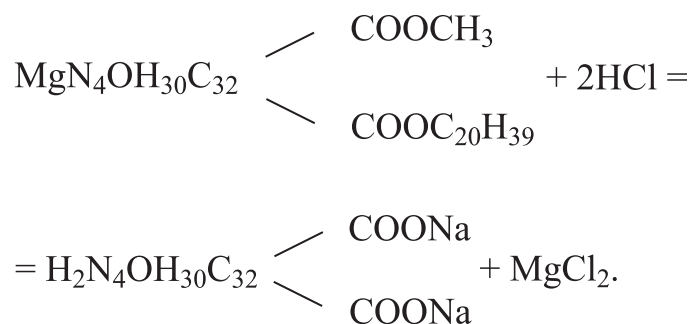
1. Каким образом происходит омыление хлорофилла?
2. Какие пигменты находятся в петролейно-эфирном слое?
3. Какие пигменты находятся в водно-спиртовом слое?
4. Почему омыленный хлорофилл перемещается из петролейно-эфирного слоя в водно-спиртовой?

Лабораторная работа 5

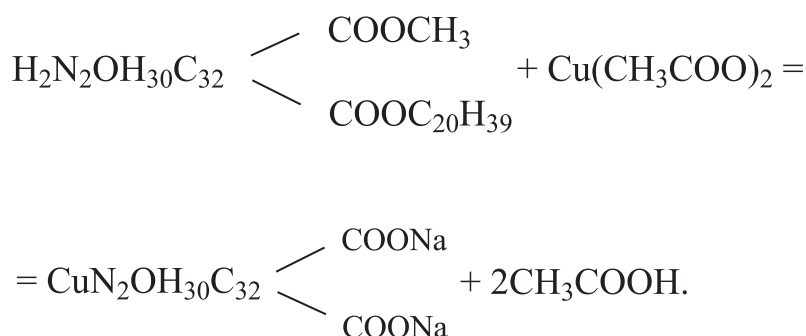
ПОЛУЧЕНИЕ ФЕОФИТИНА И ОБРАТНОЕ ЗАМЕЩЕНИЕ ВОДОРОДА АТОМОМ МЕТАЛЛА

Вводные замечания

Зеленый цвет хлорофиллу придает атом Mg, соединенный с пиррольными и пирроленинными кольцами форбинного ядра. Атом Mg сравнительно слабо удерживается в порфириновом ядре хлорофилла и при осторожном воздействии сильных кислот легко замещается двумя протонами с образованием феофитина бурого цвета:



Если на феофитин действовать солями меди, цинка, то вместо двух протонов в ядро входит соответствующий металл, и продукты реакции окрашиваются в зеленый цвет. Однако полученная окраска несколько отличается от окраски хлорофилла:



Материалы и оборудование

Спиртовая вытяжка пигментов из растительного материала; пробирки с пробками; штатив для пробирок; держатели для пробирок; пипетки; водяная баня; 20 % раствор HCl; уксусно-кислая медь или цинк.

Ход работы

В три пробирки налейте по 2–3 мл спиртовой вытяжки пигментов. Одну пробирку оставьте для сравнения. В две пробирки добавьте по 3–4 капли 20 % раствора соляной кислоты и осторожно перемешайте. Получается раствор бурого цвета. Цвет обусловлен присутствием в растворе феофитина – продукта замещения магния в молекуле хлорофилла двумя атомами водорода.

Одну из пробирок с феофитином оставьте для контроля, а во вторую внесите несколько кристаллов уксусно-кислой меди (цинка) и осторожно нагрейте на водяной бане. Бурая окраска постепенно пропадает, раствор приобретает зеленый цвет благодаря восстановлению металлоорганической связи (происходит заме-

щение водорода атомом металла). Анион уксусной кислоты, входящий в состав соли, необходим как катализатор.

Задание

Проведите извлечение атома магния из молекулы хлорофилла кислотой. Проведите реакцию по восстановлению металлоорганической связи.

Оформите работу, указав ее цель, объект исследования; опишите ход работы, полученные результаты и сделайте выводы. Результаты занесите в таблицу.

Таблица записи результатов

Слой	Цвет	Состав пигментов	Спектр поглощения	Примечание

Контрольные вопросы

1. Чем обусловлена зеленая окраска молекулы хлорофилла?
2. Чем по структуре отличаются молекулы феофитина и хлорофилла?
3. Каким образом можно восстановить металлоорганическую связь?

Лабораторная работа 6

ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХЛОРОФИЛЛА

Вводные замечания

Хлорофилл является участником и инициатором окислительно-восстановительных реакций фотосинтеза. Показать эту способность хлорофилла можно в модельном опыте с помощью двух соединений – аскорбиновой кислоты (АК) и метилового красного (МК), обладающих окислительно-восстановительными свойствами. АК участвует в необратимой окислительно-восстановительной реакции с образованием дегидроаскорбиновой кислоты (ДГАК), которая сопровождается переносом электрона к акцептору:



Таким образом, АК является восстановителем – донором электронов. Окислительно-восстановительный потенциал АК равен 0,1 эВ при рН 5,75.

МК тоже обладает окислительно-восстановительным потенциалом, равным 0,8 эВ, и является окислителем. Но из-за боль-

шой разницы потенциалов (0,7 эВ) МК не может окислить АК спонтанно. Однако осуществить окисление АК и восстановление МК можно с помощью фотосенсибилизатора, т. е. вещества, использующего энергию света и стимулирующего химическую реакцию, но не участвующего в ней. Таким фотосенсибилизатором могут быть молекулы хлорофилла. Транспорт электрона в окислительно-восстановительной реакции с участием фотосенсибилизатора (возбужденных молекул хлорофилла) представлен на рис 2. Таким образом моделируется цепь окислительно-восстановительных реакций, происходящих при фотосинтезе после поглощения света молекулами хлорофилла.

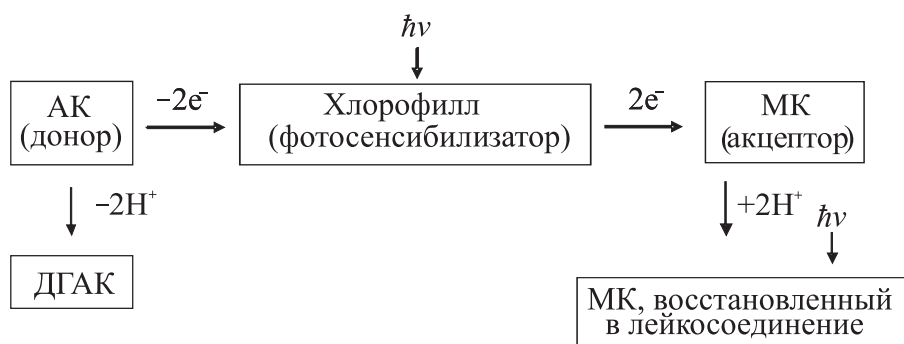


Рис. 2. Схема транспорта электрона в окислительно-восстановительной реакции фотохимической стадии фотосинтеза

В тилакоидной мембране хлоропласта хлорофилл, обладая свойствами сильного восстановителя, может восстанавливать редокс-системы с большим отрицательным потенциалом. Энергия отдаваемого при этом электрона может быть израсходована на последующие окислительно-восстановительные реакции в электрон-транспортной цепи, приводящие к созданию градиента протонов на мембране тилакоида и последующему синтезу АТФ.

Материалы и оборудование

Лампа 100 Вт; штатив; пробирки; экстракт хлорофилла; черная бумага; этанол; кристаллическая аскорбиновая кислота; насыщенный спиртовой раствор метилового красного.

Ход работы

Экстракт хлорофилла разлить поровну (по 3 мл) в четыре пробирки, в пятую налить 3 мл этанола. Затем в четыре пробирки (1, 2, 3 – с экстрактом хлорофилла, 5 – с этанолом) добавить

одинаковое количество (1–2 капли или 10–20 мкл) раствора метилового красного (МК), пока окраска экстракта не приобретет бурый цвет в пробирках с экстрактом и красный в этаноле. Много метилового красного добавлять не следует.

В пробирки 1, 2 и 5 добавить по 30 мг (на кончике скальпеля) кристаллической аскорбиновой кислоты (АК) и перемешать, встряхивая. Пробирку 2 закрыть черной бумагой. Штатив с пробирками поставить перед яркой лампой, поместив между штативом и лампой сосуд с водой таким образом, чтобы предотвратить нагревание растворов.

Через 15–20 мин после начала экспозиции в одной пробирке раствор приобретет ярко-зеленую окраску (как в контрольной пробирке 4), так как метиловый красный восстанавливается в лейкосоединение, и только хлорофилл обеспечивает зеленый цвет раствора. В остальных вариантах бурая и красная окраски не изменятся.

Задание

Результаты оформите в таблицу. Сделайте выводы относительно фотосенсибилизирующей активности хлорофилла, роли АК, МК и света.

Таблица записи результатов

Вариант опыта	Компоненты среды и освещенность	Исходная окраска раствора	Изменение окраски раствора	Причины изменения или отсутствия изменения окраски раствора
1	ХЛ+МК+АК+свет			
2	ХЛ+МК+АК+темнота			
3	ХЛ+МК+свет			
4	ХЛ+свет			
5	этанол+МК+АК+свет			

ОПТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХЛОРОФИЛЛА

Оптические явления, связанные с прохождением света через вещество, определяются особенностями разрешенных энергетических уровней молекулярных электронных оболочек. Согласно принципу Паули, наиболее устойчиво то энергетическое состояние молекулы, при котором электроны занимают самые низкоэнергетические орбиты, причем на этом уровне находится не более двух электронов с антипараллельными спинами. Такое состояние молекулы называют **основным синглетным (S_0) энергетическим состоянием**. Переход в возбужденное состояние происходит при передаче электронам энергии, равной по величине разности между разрешенным возбужденным и основным энергетическими уровнями. Такой переход возможен, например, при поглощении энергии кванта света вполне определенной величины, т. е. когда энергия электромагнитного излучения ($W_{\text{кв}}^{\text{погл}} = h\nu$) полностью поглощается валентными электронами молекулы. Таким образом, при наличии лишь одного разрешенного возбужденного энергетического уровня любое изменение длины волны падающего света делает невозможным перевод молекул в возбужденное состояние.

Реально же молекулы имеют несколько разрешенных возбужденных уровней, которые и определяют характерный для каждой молекулы спектр поглощения, при этом возможны и такие уровни возбуждения, когда электроны, находящиеся на орбитах, имеют параллельные спины (триплетные состояния). Время жизни каждого возбужденного состояния ограничено, поэтому после возбуждения молекула переходит в основное состояние в результате прямого или ступенчатого переходов валентных электронов с возбужденных на основные орбиты. Снятие возбуждения происходит в результате передачи энергии электронами (например, испускания квантов электромагнитного излучения).

Спектры поглощения хлорофилла в растворах в видимой области имеют две основные полосы: коротковолновую (для хлорофилла *a* в этанольных растворах она равна около 430 нм) и длинноволновую (для хлорофилла *a* в этанольных растворах она равна 660 нм). Коротковолновая полоса поглощения называется *полосой Core* и характерна для всех тетрапирролов, хотя ее положение определяется конкретной молекулярной структурой (у раз-

личных тетрапирролов она расположена от ближнего ультрафиолета до синей области спектра). *In vivo* хлорофилл *a* существует в нескольких формах (нативных формах хлорофилла), которые по-разному поглощают свет.

Помимо поглощения квантов света для хлорофилла характерны и другие оптические явления – флуоресценция и фосфоресценция.

Лабораторная работа 7

СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Вводные замечания

Спектры поглощения хлорофиллов в видимой области обычно имеют две основные полосы. Именно наличие двух максимумов поглощения и обуславливает характерную зеленую окраску хлорофилла.

In vivo хлорофилл *a* существует в нескольких нативных формах. Каждую из этих форм описывают в соответствии с положением максимума поглощения в красной области спектра. Наиболее известны формы хлорофилла с максимумами поглощения 680 нм и 700 нм, представленные в реакционных центрах фотосистем. Однако в растительной клетке присутствуют и иные формы хлорофилла *a*, отличающиеся от указанных положением λ_{\max} . Положение максимума поглощения всех нативных форм хлорофилла заметно отличается от такового для растворов хлорофилла в органических растворителях и определяется окружением молекулы пигмента, т. е. обусловлено взаимодействием молекул хлорофилла с белками и липидами в ламеллах хлоропластов. Например, окружение формы пигмента P_{700} таково, что соседние молекулы сильно взаимодействуют с ним, в результате чего у этого хлорофилла резко изменяется распределение электронов, что, в свою очередь, смещает максимум поглощения в длинноволновую область спектра. У всех нативных форм хлорофилла *a* красные полосы поглощения смещены в сторону больших длин волн по сравнению с тем, что наблюдается для растворов пигмента в этаноле или в эфире. Хотя положения максимумов поглощения растворов хлорофилла в указанных растворителях тоже отличаются между собой.

Материалы и оборудование

Густая суспензия *Chlorella vulgaris*; кварцевый песок; ступка; пестик; колба Бунзена; фильтр Шотта; весы лабораторные; насос Камовского; колбы конические вместимостью 50 мл (2 шт.); мел; этиловый спирт; спектрофотометр; шпатель; пипетки.

Ход работы

1 г густой суспензии хлореллы разотрите в ступке с кварцевым песком, добавив немного мела и 10 мл этилового спирта. Извлеките вытяжку пигментов из клеток водоросли подобно тому, как это описано в лабораторной работе 1. Отфильтрованную спиртовую вытяжку поместите в колбу.

Возьмите 0,01 г «пасты» хлореллы и суспендируйте водоросли в 50 мл дистиллированной воды. Заполните суспензией хлореллы кювету для спектрофотометра, поместите кювету в ячейку спектрофотометра и снимите спектр поглощения суспензии водоросли. Проведите подобную процедуру с вытяжкой пигментов из водоросли.

Задание

Зарисуйте спектры поглощения суспензии хлореллы и вытяжки пигментов. Определите положения максимумов поглощения и занесите их в таблицу. Сравните результаты определения характеристик спектров поглощения нативных форм и растворов хлорофилла.

Таблица записи результатов

Вариант	Положения максимумов поглощения, нм				Примечания
Суспензия <i>Chlorella</i>					
Вытяжка пигментов					

Контрольные вопросы

1. В каком виде представлены хлорофиллы в живой клетке?
2. Что представляет собой светособирающий комплекс фотосистем?
3. Каким образом организован реакционный центр фотосистемы II?

Лабораторная работа 8

ИЗУЧЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ РАСТВОРОВ ХЛОРОФИЛЛА

Вводные замечания

Уникальное расположение возбужденных энергетических уровней в молекулах некоторых веществ позволяет наблюдать флуоресценцию – свечение вещества иным цветом, отличным от длины волны облучаемого света. Флуоресценция возможна при наличии нескольких заметно различающихся разрешенных возбужденных энергетических уровней. При поглощении энергии кванта света, соответствующего положению коротковолнового максимума, возможен не прямой переход в основное состояние с этой электронной орбиты, а ступенчатый (переход на промежуточный разрешенный возбужденный уровень и затем в основное энергетическое состояние). При этом поглощенный и излучаемый свет отличаются по длине волны.

Для молекулы хлорофилла характерно наличие как минимум двух (не считая колебательных подуровней и триплетного уровня) максимумов поглощения (в голубой и красной областях спектра), при этом возможен переход на другой возбужденный уровень, формирующийся при поглощении длинноволнового кванта света. Вероятность таких переходов зависит от многих факторов, поэтому интенсивность флуоресценции растворов хлорофилла в различных растворителях неодинакова, а агрегированный хлорофилл в нативном состоянии (в живом листе) флуоресцирует слабо. В соответствии с правилом Стокса положение максимума флуоресценции хлорофилла *a* (668 нм) отличается от положения максимума поглощения.

Флуоресценцию растворов хлорофилла можно наблюдать и без специальной приборной базы. В этом случае предлагается рассматривать спиртовую вытяжку пигментов в проходящем и отраженном свете. Цвет раствора хлорофилла определяется положением максимумов поглощения: из непрерывного спектра белого света удаляются полосы синего и красного цветов, поэтому в проходящем свете спиртовая вытяжка пигментов (или их раствор в эфире) имеет изумрудно-зеленую окраску. Для наблюдения же свечения раствора хлорофилла, связанного с флуоресценцией, следует рассматривать сосуд с раствором пигмента в отраженном

свете на темном фоне. В этом случае подложка из темного материала интенсивно поглощает свет осветителя (в том числе и прошедший через вытяжку пигментов), что позволяет увидеть слабое собственное свечение хлорофилла, которое проявляется в появлении кирпично-красной окраски у вытяжки хлорофилла при определенном положении сосуда, осветителя и наблюдателя.

Однако нагляднее продемонстрировать флуоресценцию можно при использовании специальных приспособлений, позволяющих наблюдать за состоянием раствора хлорофилла под углом 90° по отношению к лучам, исходящим от осветителя. В этом случае в значительной степени исключаются визуальные эффекты, связанные с прохождением белого полихроматического света через раствор пигментов. Поток квантов света от осветителя движется в определенном направлении, а при прохождении через раствор поглощается (или ослабляется) свет определенных длин волн, в этом случае увидеть слабое свечение хлорофилла, обусловленное флуоресценцией, невозможно из-за высокой интенсивности лучей зеленого цвета.

Несмотря на то что кванты света от осветителя движутся в строго определенном направлении, после их поглощения молекулой последующее испускание (при прямом или ступенчатом переходе из возбужденного в основное состояние) происходит от молекулы хлорофилла в растворе уже в любую сторону. Поэтому, поместив кювету с вытяжкой пигментов в специальную камеру, покрытую изнутри светопоглощающим материалом (например, черным бархатом) и имеющую три отверстия в корпусе (два напротив, а одно перпендикулярно направлению потока света от осветителя), можно наблюдать красное свечение вытяжки, яркость которого зависит от интенсивности облучения. Наблюдать кювету с вытяжкой пигментов следует через отверстие в камере, расположенное под углом 90° по отношению к направлению лучей света от осветителя: проходящий свет не изменяет своего направления, а испускаемые молекулами хлорофилла кванты (их длины волн соответствуют красному цвету) излучаются во всех направлениях (в том числе и перпендикулярно направлению луча от осветителя). Флуоресценцию хлорофилла можно наблюдать и в проходящем свете. Для этого раствор пигмента следует освещать потоком квантов, соответствующим коротковолновому максимуму поглощения, – синим светом. Этот

максимум выражен более отчетливо, чем в длинноволновой области, а наблюдаемое красное свечение явно выделяется на темном фоне.

Для исследования спектров флуоресценции используются специальные приборы – спектрофлуориметры. При выполнении работы воспользуемся простейшим флуориметром. Схема устройства прибора изображена на рис. 3. Свет от осветителя *A* проходит через синий светофильтр *B* и через кювету *C* с раствором исследуемого вещества. Для наблюдения флуоресценции применяется красный светофильтр *D*. Светофильтр *D* красного цвета не пропускает синие лучи, прошедшие через светофильтр *B*, поэтому при наблюдении за источником света без кюветы с исследуемым раствором через систему светофильтров *B–D* при идеальных условиях вы должны увидеть темное поле зрения. Однако светофильтры в виде цветных стекол не идеальны: они лишь сильно ослабляют интенсивность лучей, не относящуюся к области светопропускания, по длине волны. При значительной интенсивности освещения абсолютно темного поля зрения при прямом рассмотрении источника света через систему светофильтров *B–D* не будет. Для избежания влияния фона осветителя кювету с раствором хлорофилла следует рассматривать через светофильтр *D* под углом. Поскольку направление испускания квантов света при флуоресценции не совпадает с направлением светового потока от осветителя, в этом случае будет легче обнаружить свечение раствора в кювете.

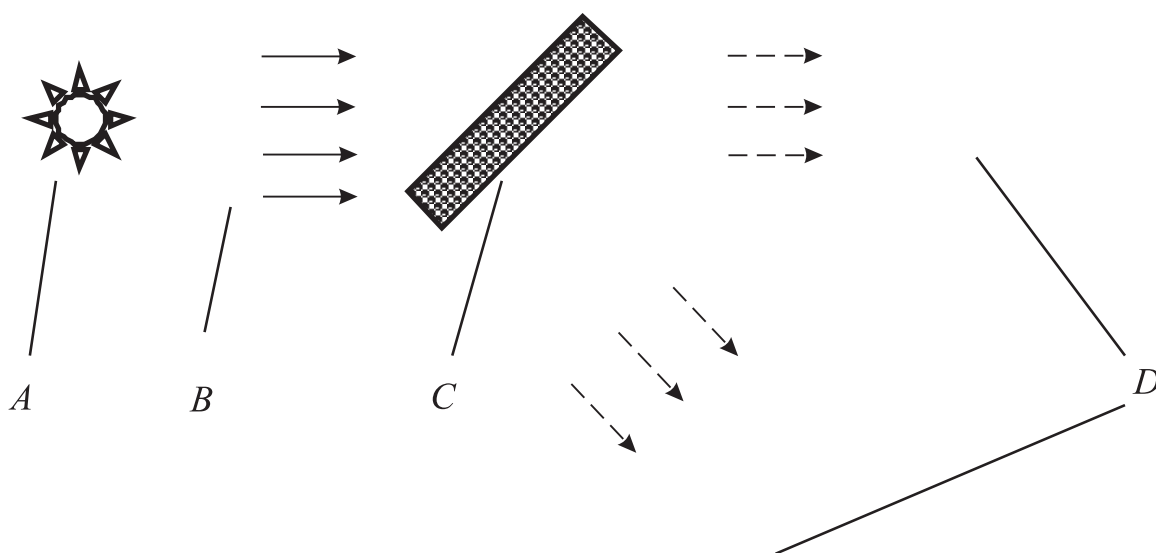


Рис. 3. Схема флуориметра

Материалы и оборудование

Этанольная вытяжка фотосинтетических пигментов; густая суспензия *Chlorella vulgaris*; этиловый спирт; стеклянная кювета для колориметрии; стеклянные пробирки (3 шт.); набор светофильтров; флуориметр; спектроскоп; осветитель для микроскопии ОИ-19.

Ход работы

1. Рассмотрение раствора хлорофилла в отраженном свете. Поместите пробирку со спиртовой вытяжкой хлорофилла на темный фон. Включите осветитель и рассматривайте сосуд с раствором хлорофилла со стороны источника света. Источник света должен находиться между вами и сосудом с раствором хлорофилла таким образом, чтобы его яркий свет не мешал наблюдению. Немного перемещая сосуд вправо и влево, добейтесь появления кирпично-красной окраски вытяжки хлорофилла.

2. Рассмотрение вытяжки пигментов под углом 90° к осветителю. Налейте в кювету спирт. Поместите кювету со спиртом в темную камеру. Поместите камеру на подставку перед осветителем. Включите осветитель. Посмотрите на содержимое кюветы в положении, противоположном осветителю, и под углом 90° через специальные отверстия в камере. Замените спирт в кювете на вытяжку пигментов. Прделайте те же процедуры.

3. Наблюдения спектров флуоресценции хлорофилла. Налейте в кювету спирт. Поместите кювету со спиртом во флуориметр. Осветите ее синим светом. Посмотрите на кювету через красный светофильтр в положении, противоположном осветителю, и под углом.

Налейте в кювету спиртовую вытяжку хлорофилла. Поместите кювету с раствором хлорофилла во флуориметр. Осветите ее синим светом. Посмотрите на кювету через красный светофильтр в положении, противоположном осветителю, и под углом 90°.

Вместо красного светофильтра поместите в окулярное отверстие флуориметра спектроскоп. Рассмотрите спектр света, исходящего от кюветы с хлорофиллом.

Поменяйте местами синий и красный светофильтры. Прделайте те же наблюдения.

4. Наблюдение флуоресценции хлорофилла *in vivo*. Налейте в кювету суспензию клеток микроводорослей *Chlorella* (хлорелла).

Поместите кювету в темновую камеру флуориметра и осветите ее синим светом с помощью осветителя. Посмотрите на кювету через красный светофильтр в положении, противоположном осветителю, и под углом 90° . Флуоресценция нативных форм хлорофилла слишком слаба, ведь снятие возбуждения с молекулы пигмента путем флуоресценции не способствует продуктивной передаче энергии на реакционный центр. Кроме того, клетки микроводорослей способны рассеивать свет, как и любая мелкодисперсная взвесь, поэтому при освещении белым светом флуоресценция хлорофилла, включенного в фотосинтетический аппарат, будет слабозаметна.

Для наблюдения флуоресценции суспензии водорослей используйте красный светофильтр.

Задание

Опишите результаты наблюдений и занесите их в таблицу. Укажите, при каких условиях отмечается наибольшая яркость поля зрения. Ответьте на контрольные вопросы.

Таблица записи результатов

Вариант	Белый свет		Синий свет		Примечания
	Цвет в проходящем свете	Цвет под углом 90° к осветителю	Цвет в проходящем свете	Цвет под углом 90° к осветителю	
Спирт					
Вытяжка пигментов					
Суспензия хлореллы					

Контрольные вопросы

1. Почему длина волны излучаемого при флуоресценции света больше, чем возбуждающего?
2. Почему в спектре прошедшего через раствор хлорофилла света появляются красные лучи?
3. Почему невозможно возбудить сине-голубую флуоресценцию хлорофилла освещением его раствора красным светом?

МЕТОДЫ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ПИГМЕНТОВ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ

При исследовании природных соединений достаточно часто возникает необходимость их выделения и очистки, т. е. проведения качественного анализа. Один из наиболее удобных и тонких методов разделения смеси – хроматографический.

Термин «хроматография» предложен первооткрывателем метода, русским химиком М. С. Цветом в 1906 г. М. С. Цвет применил его для разделения растительных пигментов в трубке, наполненной сухим твердым адсорбентом (сахароза). Экстракт пигментов вводился в трубку (впоследствии названную колонкой), которую затем промывали (или элюировали) органическим растворителем. Компоненты экстракта двигались по колонке с различной скоростью, образуя отдельные окрашенные полосы. После полного разделения полос влажный столбик адсорбента осторожно извлекался из колонки и разрезался на части, каждая из которых содержала определенный пигмент.

Хроматография основана на распределении веществ между двумя фазами – неподвижной (может быть твердой, жидкой или смесью твердой и жидкой) и подвижной (жидкой или газообразной). Подвижная фаза пропускается через неподвижную. Распределение веществ между двумя несмешивающимися фазами определяется различными факторами (растворимостью, сорбцией и т. п.) и может быть выражено коэффициентом распределения, т. е. отношением концентрации вещества в подвижной фазе к его концентрации в неподвижной фазе. Вещества с более высоким коэффициентом распределения продвигаются по сорбенту с большей скоростью, отделяясь от веществ с более низким коэффициентом.

Характерной особенностью пигментов является способность поглощать свет определенных длин волн. Этим свойством пигментов обычно пользуются при проведении анализа их количественного содержания в растениях. Использование оптических методов позволяет установить содержание отдельных пигментов в смеси без разделения последней на компоненты.

В зависимости от того, какая аппаратура используется в ходе исследования, все фотометрические методы подразделяются на спектрофотометрические и фотоколориметрические. Анализ с использованием этих методов производится по поглощению мо-

нохроматического света видимой области спектра. Оба метода основаны на законах Бугера-Ламберта и Бера.

Закон Бугера-Ламберта устанавливает зависимость количества монохроматического света, поглощенного веществом, от толщины поглощающего слоя, т. е. длины оптического пути.

Закон Бера устанавливает прямо пропорциональную зависимость между поглощением света и концентрацией вещества в растворе.

В соответствии с законами Бугера-Ламберта и Бера между поглощением света раствором, длиной оптического пути и концентрацией в растворе поглощающего вещества существует определенная зависимость, которая выражается уравнением

$$\lg I_0 / I = \varepsilon cd,$$

где I_0 – интенсивность падающего света; I – интенсивность прошедшего света; ε – коэффициент поглощения (или коэффициент экстинкции) вещества; c – концентрация вещества; d – толщина слоя.

Величину $\lg I_0 / I$ обозначают символом D и называют поглощением (или оптической плотностью).

Количество хлорофиллов a и b , их суммарное содержание ($a+b$), соотношение хлорофилла a к хлорофиллу b , содержание каротина, ксантофиллов, суммы всех каротиноидов, соотношение зеленых пигментов к желтым в листьях зависят от жизнедеятельности организма, его генетической природы. Поэтому оно может быть использовано как физиологический показатель, характеризующий онтогенетические, возрастные и генетические особенности растений. Количество пигментов отражает и реакцию растительного организма на условия произрастания. Поэтому при физиологических исследованиях часто возникает необходимость проследить за динамикой содержания хлорофилла и каротиноидов в отдельных органах. Такого рода наблюдения можно производить с использованием фотометрических методов исследования.

Лабораторная работа 9

РАЗДЕЛЕНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ МЕТОДОМ ОДНОМЕРНОЙ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Вводные замечания

Одним из широко применяемых методов для быстрого разделения малых количеств пигментов, находящихся в смеси, на отдельные компоненты является метод бумажной хроматографии.

К настоящему времени предложено много вариантов бумажной хроматографии: восходящие и нисходящие, одномерные, двухмерные и круговые хроматограммы с применением разных растворителей. При восходящей хроматографии бумажную полосу погружают в растворитель вертикально, таким образом, чтобы нижний конец хроматографической бумаги был погружен в растворитель, но при этом область нанесения вытяжки пигментов находилась выше уровня растворителя. По мере движения растворителя под действием капиллярных сил вертикально вверх происходит разделение смеси растворенных веществ. При нисходящей хроматографии верхний конец бумажной полосы со смесью пигментов, нанесенных недалеко от кромки бумаги, закрепляют в лотке, который размещают в верхней части камеры. В результате действия капиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает передвигаться вниз по бумажной полосе, в результате чего смесь разделяется. Восходящую хроматографию как более простую применяют чаще.

Выбор метода разделения пигментов зависит от задачи исследования. Например, для двухмерных хроматограмм исходная смесь наносится в виде небольшого пятна (можно разделить только малые количества пигментов) и разгоняется в двух направлениях. Если нужны большие количества пигментов для количественных определений или других целей, то лучше проводить разделение пигментов на одномерной хроматограмме и наносить экстракт не в виде пятна, а в виде полоски на одном конце бумаги. Еще одним немаловажным преимуществом одномерной хроматограммы является большая скорость разделения и получение достаточного количества отдельных пигментов.

Расстояние, пройденное нанесенным на бумагу пигментом в направлении движения растворителя, характеризуется величиной R_f , которая представляет собой отношение расстояния, пройденного растворенным веществом, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя:

$$R_f = \frac{\text{расстояние, пройденной растворенным веществом}}{\text{расстояние, пройденное фронтом растворителя}}$$

В стандартных условиях эта величина для данного пигмента постоянна и соответствует его коэффициенту распределения. R_f – величина безразмерная и имеет значение от 0 до 1. Однако в литературе нередко встречаются такие показатели, как hR_f , $R_f \times 100$, для того чтобы не оперировать десятичными значениями. Показатель R_f зависит как от свойств разделяемых веществ, состава подвижной

фазы и сорбента, так и от физических параметров. На значение R_f не влияет расстояние, пройденное фронтом растворителя, однако во многих методиках описывается прохождение фронта на расстояние 10 см. Это используется только для облегчения расчетов R_f .

Материалы и оборудование

Ацетоновая или спиртовая вытяжка пигментов; петролейный эфир; ацетон; дистиллированная вода; хроматографические камеры; хроматографическая бумага; стеклянные капилляры; делительные воронки.

Ход работы

Для разделения на бумаге все пигменты из ацетоновой или спиртовой вытяжки переведите в петролейный эфир (эфир быстро испаряется, а бумага не размокает). Для этого в делительную воронку перенесите 10 мл вытяжки пигментов и добавьте 15 мл петролейного эфира, смесь перемешайте. Затем добавьте порцию воды (30 мл), вновь перемешайте взбалтыванием, дайте отстояться нижнему водно-спиртовому или водно-ацетоновому слою и слейте его. Промывание повторите 3–5 раз, каждый раз удаляя водную фазу с ее содержимым.

Приготовьте элюент (подвижную фазу) для хроматографии, который состоит из семи частей петролейного эфира и одной части ацетона. Полученную смесь растворителей налейте в хроматографическую камеру слоем не более 1 см, так как уровень растворителя должен быть ниже линии старта на хроматографической бумаге. Камеру плотно закройте крышкой для предварительного (в течение 10–15 мин) насыщения ее внутреннего объема парами растворителей.

Из хроматографической бумаги вырежьте полосу шириной 7–8 см и высотой 15 см. На расстоянии 1,5–2 см от нижнего края полоски простым карандашом проведите линию старта. Затем с помощью стеклянного капилляра на отмеченную линию нанесите смесь пигментов в петролейном эфире. Бумагу подсушите и затем снова нанесите вытяжку пигментов. Эту операцию повторяют 8–10 раз до тех пор, пока на линии старта не образуется темно-зеленая полоса смеси пигментов.

После нанесения вытяжки бумагу поместите в хроматографическую камеру так, чтобы растворитель не касался зоны пигментов. Камеру плотно закройте и оставьте на 15–20 мин. В течение указанного времени растворитель поднимается по бумаге на высоту 10–12 см. Смесь пигментов при этом должнаделиться на отдель-

ные компоненты в виде полос: снизу – желто-зеленый хлорофилл *в*, над ним – сине-зеленый хлорофилл *а* (зона которого в 2–3 раза шире зоны хлорофилла *в*), затем ксантофилл(-ы). Каротин продвигается вместе с фронтом растворителя быстрее других компонентов, и его зона располагается на бумаге выше остальных пигментов.

Задание

Зарисуйте полученную хроматограмму. Определите R_f каждого пигмента. Проведите анализ полученной хроматограммы. Результаты исследования занесите в таблицу.

Таблица записи результатов

Цвет зоны	Величина R_f	Пигмент
Оранжевый		
Желтый		
Сине-зеленый		
Желто-зеленый		

В выводах объясните наблюдаемое разделение пигментов.

Контрольные вопросы

1. На чем основан хроматографический метод разделения пигментов?
2. Какую окраску имеют полосы на хроматографической бумаге, соответствующие хлорофиллам *а* и *в*?
3. О чем может свидетельствовать более низкое значение R_f хлорофилла *в* по сравнению с хлорофиллом *а*?
4. В каком соотношении хлорофиллы *а* и *в* находятся в зеленом листе? Каким образом это подтверждается с помощью полученной хроматограммы?

Лабораторная работа 10

РАЗДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ПО М. С. ЦВЕТУ)

Вводные замечания

Принцип метода заключается в том, что разделяемые вещества избирательно адсорбируются из какого-либо растворителя на твердом порошкообразном адсорбенте. Обычно применяемые адсорбенты – кремниевая кислота, окись алюминия, карбонат

кальция, карбонат цинка и окись магния. Для получения хроматограмм пигментов М. С. Цвет применял полярные адсорбенты и неполярные растворители с низкой диэлектрической постоянной и малой диссоциирующей силой (петролейный эфир, бензол, сероуглерод). Растворители с большой диэлектрической постоянной (ацетон, этанол) способствуют элюции пигментов. Поэтому необходимо, чтобы в применяемых органических неполярных растворителях не было примесей, снижающих активность адсорбентов. Таким образом, выбор растворителя и адсорбента в адсорбционной хроматографии не случаен, а взаимосвязан. Эффективность разделения также сильно зависит от правильного заполнения колонки адсорбентом.

Материалы и оборудование

Спиртовая или ацетоновая вытяжка пигментов; петролейный эфир; сахароза; стеклянные трубки длиной 15 см, диаметром 1 см; колбы Бунзена; воронки со стеклянным фильтром; стеклянные палочки; насос.

Ход работы

Для разделения пигментов на сахарной пудре по методу Цвета необходимо все пигменты из ацетоновой или спиртовой вытяжки перевести в петролейный эфир, как описано в лабораторной работе 9.

Хроматографическая колонка готовится следующим образом. В узкий конец стеклянной трубки заложите кусочек ваты. После этого равномерно набейте колонку растертой сахарной пудрой. Адсорбент уплотняется стеклянной палочкой или постукиванием колонкой о твердую поверхность. Колонка заполняется до тех пор, пока уровень адсорбента в трубке не будет на 2–3 см ниже верхнего ее края. Готовую к работе колонку соедините с колбой Бунзена.

Первоначально смочите адсорбент петролейным эфиром, затем внесите в колонку экстракт пигментов. Дайте раствору пигментов проникнуть в верхние слои адсорбента, а потом используйте вакуум-насос. В результате получается первичная хроматограмма. Если полного разделения смеси не произошло ввиду того, что зоны отдельных пигментов заходят одна в другую, колонку необходимо промыть смесью петролейного эфира и бензола в соотношении 10 : 1. Под влиянием передвигающихся

растворителей, конкурирующих с адсорбентом за связывание вещества, произойдет четкое обособление окрашенных зон.

В конечном итоге пигменты расположатся следующим образом. Самая верхняя желто-зеленая зона – хлорофилл *b*, ниже – сине-зеленая зона – хлорофилл *a*, и, наконец, в самом низу – ярко-желтая зона – ксантофилл. Каротин вместе с растворителями полностью переходит в колбу.

Задание

Зарисуйте полученную хроматограмму, в выводах объясните наблюдаемое разделение пигментов.

Контрольные вопросы

1. Какие адсорбенты обычно используются для проведения колоночной адсорбционной хроматографии?
2. От чего зависит эффективность разделения пигментов по методу М. С. Цвета?
3. Какие из фотосинтетических пигментов имеют наибольшее сродство к подвижной неполярной фазе?

Лабораторная работа 11

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ

Вводные замечания

Одним из наиболее удобных и точных методов определения содержания каждой группы фотосинтетических пигментов (каротин, хлорофилл *a*, хлорофилл *b* и т. д.) является установление их количества в вытяжке с помощью спектрофотометра. Этот метод позволяет установить концентрации отдельных пигментов без предварительного разделения вытяжки на компоненты и калибровочных кривых. Расчет содержания отдельных веществ в смеси производится по формулам, учитывающим положения максимумов поглощения пигментов и содержащим поправочные коэффициенты на наличие других пигментов и компонентов, рассеивающих свет.

Количество пигментов можно выражать в мг или в % в расчете на 1 г сырой или сухой массы, единицу площади (см^2 , дм^2) листа. Содержание хлорофиллов в листьях растений составляет в среднем около 0,3 % сырой массы (0,1–0,7 %). Каротиноидов в листьях примерно в 3–8 раз меньше, чем хлорофиллов.

Определение количества пигментов лучше всего проводить в свежих листьях. Однако если анализ на свежем материале сразу провести невозможно, то его необходимо зафиксировать горячим паром в течение двух минут для предотвращения гидролиза хлорофиллов под действием хлорофиллазы. Растительный материал после фиксации высушивают между листами фильтровальной бумаги и хранят в темном и сухом месте.

Материалы и оборудование

Листья комнатных растений; этиловый спирт; ацетон; мерные цилиндры; кварцевый песок; колбы Бунзена; воронки со стеклянным фильтром; стеклянные палочки; фарфоровые ступки с пестиками; насос; спектрофотометр.

Ход работы

Получите вытяжку пигментов из зеленых листьев растений, как описано в лабораторной работе 1. Для этого используйте навеску 0,3–0,5 г и 100 % ацетон или 96 % этиловый спирт. **Необходимо произвести максимально полную экстракцию пигментов из растительного материала!** Для определения сухого вещества берут аналогичные навески, помещают в металлический бюкс и высушивают при $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ до постоянного веса.

Для анализа количества пигментов на единицу площади листа из средней его части по одну сторону от главной жилки пробочным сверлом с диаметром 6–8 мм сделайте 10–15 высечек, которые будут использованы для извлечения пигментов.

Полученный экстракт из колбы Бунзена перенесите в мерный цилиндр и доведите до определенного объема ацетоном или спиртом. Определение концентрации пигментов без их предварительного разделения проводится на спектрофотометре при длинах волн: для ацетона – 662, 644, 440 нм, для спирта – 665, 649, 440 нм. Мутность раствора измеряется при 720 нм. Показания спектрофотометра при 720 нм вычитаются из показаний при других длинах волн.

Концентрация пигментов (C) в мг/л вычисляется по формулам:

для 100 % ацетона:

$$C_a = 9,784 \cdot D_{662} - 0,990 \cdot D_{644},$$

$$C_b = 21,426 \cdot D_{644} - 4,650 \cdot D_{662},$$

$$C_k = 4,695 \cdot D_{440} - 0,268 \cdot C_{a+b};$$

для 96 % спирта:

$$C_a = 13,7 \cdot D_{665} - 5,76 \cdot D_{649},$$

$$C_b = 25,3 \cdot D_{649} - 7,6 \cdot D_{665},$$

где C_a – концентрация хлорофилла *a* в мг/л; C_b – концентрация хлорофилла *b* в мг/л; C_k – концентрация каротиноидов в мг/л; D – найденное для исследуемого экстракта поглощение (при толщине слоя 1 см) при указанных длинах волн.

Определение количества пигментов в расчете на 1 г или 1 дм² проводится по формулам:

$$A = (C \cdot V) / (1000 \cdot m); \quad B = (C \cdot V) / (1000 \cdot S),$$

где A – количество пигментов, в мг/г сухой или сырой массы; B – количество пигментов, в мг/дм²; C – концентрация пигментов, в мг/л; V – объем вытяжки пигментов, в мл; m – навеска, в г; S – площадь всех дисков, в дм².

Задание

На основании данных об оптической плотности спиртовой либо ацетоновой вытяжки пигментов при определенных длинах волн проведите расчет содержания хлорофиллов *a* и *b*, а также каротиноидов на единицу сырой и сухой массы растения (либо единицу площади листовой поверхности). Сделайте вывод о количественном соотношении хлорофилла *a* : хлорофилла *b* : каротиноидов в исследуемом объекте. Результаты занесите в таблицу.

Таблица записи результатов

m , г	V , мл	D_{662}	D_{644}	D_{440}	D_{720}	C_a	C_b	C_k

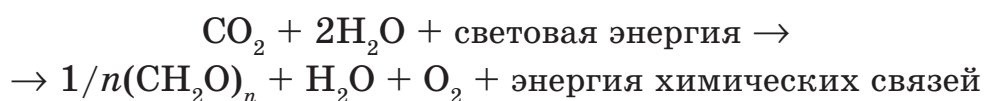
Контрольные вопросы

1. На чем основан спектрофотометрический метод определения содержания пигментов?
2. В чем заключается сущность законов Бугера-Ламберта и Бера?
3. Зависит ли положение максимумов поглощения пигментов от природы растворителя?
4. Почему при спектрофотометрическом определении содержания пигментов производится измерение поглощения экстракта при 720 нм? Каким образом эта величина учитывается при выполнении расчетов?
5. Во сколько раз содержание хлорофиллов *a* и *b* может превышать суммарное содержание каротиноидов в растительном материале?

Часть II

БИОХИМИЯ ФОТОСИНТЕЗА

Физиология растений – наука экспериментальная и нуждается в методах, которые давали бы возможность надлежащим образом оценивать количественные параметры тех или иных процессов. Из общего уравнения фотосинтеза



следует, что для количественной оценки скорости фотосинтеза или скоростей отдельных реакций, связанных с фотосинтезом, теоретически пригодны шесть показателей. Пять из них, а именно поглощение CO_2 , выделение O_2 , прирост сухой массы, общее количество запасенной энергии и количество поглощенной энергии, давно используются для такой оценки. Шестой показатель – включение воды в реакции фотосинтеза – не используется. Его применение для определения интенсивности фотосинтеза затруднено из-за обилия воды в тканях растения и участия во многих биохимических превращениях.

Наиболее часто для оценки интенсивности фотосинтетических процессов применяются методы, основанные на определении скорости выделения кислорода и поглощения углекислого газа растениями. Каждая из указанных групп методов имеет свои преимущества и недостатки. Например, неудобство методов, связанных с учетом поглощения CO_2 , состоит в том, что углекислота служит субстратом для фотосинтеза, а потому изменения ее концентрации влияют на скорость фотосинтетических превращений гораздо сильнее, чем изменения концентрации кислорода. В то же время концентрация углекислого газа проще определяется различными физико-химическими методами.

СВЕТОВАЯ СТАДИЯ ФОТОСИНТЕЗА

Световая стадия процесса фотосинтеза представляет собой цепь последовательных окислительно-восстановительных превращений определенных компонентов фотосинтетического аппарата растений. Эти процессы именуются транспортом электронов, а совокупность компонентов, подвергающихся обратимому восстановлению с последующим окислением, – электрон-транспортной цепью фотосинтетического аппарата. Функционирование электрон-транспортной цепи фотосинтетического аппарата возможно только за счет энергии квантов света, поглощенной пигментами.

В процессах переноса электронов во время световой стадии фотосинтеза осуществляется восстановление НАД, НАДФ и других адениловых коферментов, используемых в дальнейших биохимических реакциях темновой фазы фотосинтеза, а также происходят первичные процессы преобразования электромагнитной энергии квантов света, в результате чего на мембранах тилакоидов создается разность электрохимических потенциалов ионов водорода. За счет последней в дальнейшем синтезируется АТФ из АДФ и неорганического фосфата.

Создание разности электрохимических потенциалов на мембране тилакоидов – это результат как фоторазложения воды, так и переноса ионов водорода из стромы хлоропластов внутрь тилакоидов, сопряженного с функционированием электрон-транспортных цепей. Таким образом, основное назначение световой фазы фотосинтеза – это преобразование энергии, а также синтез АТФ, восстанавливающих агентов, участвующих в реакциях биосинтеза органических соединений из CO_2 .

Синтез АТФ и восстановление адениловых коферментов можно замедлить, воздействуя на процессы переноса электронов. В то же время есть еще одна возможность ингибирования синтеза АТФ – использование разобщителей фосфорилирования (например, 2,4-динитрофенола). Такие агенты не влияют на функционирование электрон-транспортных цепей, однако не позволяют создать разность электрохимических потенциалов ионов водорода, достаточную для биосинтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата.

Характерным процессом, маркирующим световую стадию фотосинтеза, является выделение кислорода. Кислород, выделяемый при фотосинтезе, напрямую растениями не используется и образуется как побочный продукт фоторазложения воды. Однако

в этом явлении и заключается одна из основных экологических задач, решаемых фотосинтезирующими растениями в планетарном масштабе на протяжении сотен миллионов лет.

Лабораторная работа 12

ОБНАРУЖЕНИЕ ВЫДЕЛЕНИЯ КИСЛОРОДА РАСТЕНИЯМИ НА СВЕТУ (ПО МЕТОДУ САПОЖНИКОВА)

Вводные замечания

Характерной особенностью фотосинтезирующих растений является выделение газообразного кислорода при фотосинтезе. На протяжении десятилетий модификации газометрических методов были положены в основу различных способов и приборов (например, аппарата Варбурга) для определения интенсивности фотосинтеза.

В лабораторной работе демонстрируется выделение газообразного кислорода (а точнее, газа) на свету листьями растений. Лист – главный фотосинтезирующий орган высших растений. Характерная особенность анатомического строения листа – наличие в нем мезофилла. При этом клетки в мезофилле упакованы неплотно, а между ними имеется значительное пространство, заполненное не жидкостью, а газом. Эта полость листа необходима для осуществления эффективного газообмена при транспирации.

Однако наличие такой полости определяет положительную плавучесть листьев многих растений. Если заполнить ее жидкостью, то лист потеряет плавучесть и потонет. Предлагаемый принцип демонстрации выделения газообразного кислорода при фотосинтезе как раз и заключается в том, что образующийся кислород должен вытеснять жидкость, которой предварительно заполняются межклетники мезофилла, и тогда лист всплывает. Чтобы заполнить межклетники мезофилла листовых высечек, из последних удаляется воздух посредством создания временного разрежения. Для предотвращения гидростатического разрушения клеток в полости мезофилла вводится не вода, а слабогипотонический раствор бикарбоната натрия. Раствор бикарбоната натрия используется также для снижения поверхностного натяжения воды (чтобы она легче проникала в ткани листа) и растворимости кислорода.

Материалы и оборудование

Листья растений со слабым «опушением»; сверло для пробок; 1 % раствор бикарбоната натрия; колбы конические вместимостью 200–500 мл (2 шт.); колба Бунзена; насос Камовского; светонепроницаемый колпак.

Ход работы

Сверлом для пробок сделайте 16–20 высечек из листьев в виде дисков. Поместите высечки листа в колбу Бунзена, добавьте туда 20–50 мл 1 % раствора бикарбоната натрия. Закройте колбу пробкой и соедините с насосом Камовского. Откачивайте воздух из колбы. Воздух, заполняющий межклетники мезофилла, будет выходить, что можно видеть по появлению пузырьков на краях высечек. После отключения насоса (снятия шланга) происходит инфильтрация жидкости в ткани листа за счет разности давлений, и раствор бикарбоната натрия поступает в межклетники. Процедуру создания разрежения и последующего отключения насоса повторяют несколько раз, пока высечки не опустятся на дно сосуда.

После этого содержимое колбы Бунзена разделите на две приблизительно равные части и поместите в две конические колбы. Одну колбу разместите под светонепроницаемый колпак, а вторую – на яркий свет. Инкубируйте высечки в указанных условиях 20–30 мин.

Задание

По прошествии 20–30 мин инкубации рассмотрите высечки в каждой из колб. Подсчитайте общее количество высечек в каждом из вариантов опыта и количество всплывших из них. Результаты наблюдений занесите в таблицу. Сделайте заключение о воздействии света на плавучесть высечек листа.

Таблица записи результатов

Вариант	Общее количество высечек	Число всплывших высечек	Время инкубации, мин
Свет			
Темнота			

Контрольные вопросы

1. Для чего высечки листа подвергаются периодическому разрежению?
2. Почему происходит всплытие высечек на свету?
3. Каким образом осуществляются процессы газообмена в тканях листа?

Лабораторная работа 13

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ O₂ КЛЕТКАМИ ВОДОРΟΣЛИ *CHLORELLA* (ХЛОРЕЛЛА) НА СВЕТУ

Вводные замечания

Исходно в воздухе содержится достаточно много кислорода, поэтому трудно зарегистрировать изменение его содержания. В то же время возможно создание модельной системы среды, где содержание кислорода будет низким. Это свежепрокипяченная и остуженная в плотно закрытом сосуде вода. Для регистрации выделения кислорода растениями на свету в этой модельной системе удобно использовать водные растения, например зеленые водоросли, процессы фотосинтеза в которых весьма сходны с фотохимическими превращениями, протекающими в высших растениях.

Для определения концентрации растворенного в воде кислорода в работе используется метод Винклера, который основан на оценке количества окисленных кислородом ионов двухвалентного марганца до трех- и четырехвалентного состояния. Процесс же окисления марганца оценивается по количеству молекулярного иода, образующегося при взаимодействии трех- и четырехвалентных соединений марганца с иодидом калия. Таким образом, содержание молекулярного иода должно быть эквивалентно количеству кислорода в пробе. В этом случае задача сводится к определению содержания иода в растворе после проведения соответствующих аналитических процедур. Это может быть осуществлено, например, титрованием раствором тиосульфата натрия с добавлением крахмала как индикатора.

Выделение кислорода при функционировании фотосинтетического аппарата связано со световой стадией фотосинтеза, а точнее, с нециклическим транспортом электронов. С этим же видом транспорта электронов связаны и процессы фиксации CO₂. Таким образом, оценивая скорость выделения кислорода, можно судить об интенсивности фотосинтетических процессов в растениях. Зачастую подобные оценки и являются количественными показателями интенсивности фотосинтеза. Однако не следует забывать, что, хотя темновая стадия фотосинтеза связана с фотохимическими процессами, это совершенно различные явления.

Для функционирования открытой цепи фотосинтетического транспорта электронов необходима работа как фотосистемы II,

так и фотосистемы I. При освещении растений светом дальней красной области спектра (более 700–720 нм) реакционный центр фотосистемы II не должен возбуждаться, хотя фотосистема I может функционировать. В этих условиях происходит циклический фотосинтетический транспорт электронов. Нарушить работу открытой цепи переноса электронов можно, заблокировав транспорт электронов от фотосистемы II к фотосистеме I специальными химическими агентами (например, гербицидом диуроном).

Материалы и оборудование

Суспензия культуры водоросли *Chlorella* (хлорелла); свежeproкипяченная остуженная дистиллированная вода; сантинормальные растворы диурона, 2,4-динитрофенола и тиосульфата натрия; секундомер; пробирки центрифужные с крышкой вместимостью 50 мл (6 шт.); пробирки для сахарометрии (6 шт.); раствор хлористого марганца (№ 1); раствор иодида калия в концентрированном растворе гидрата окиси натрия (№ 2); раствор серной кислоты (№ 3); раствор крахмала; шприцы емкостью 2–5 мл (3 шт.); стакан химический вместимостью 50 мл; центрифуга; осветитель для микроскопии; черная бумага; красный светофильтр.

Ход работы

Возьмите шесть чистых центрифужных пробирок. Налейте в пять из них по 50 мл суспензии клеток культуры водоросли *Chlorella* (хлорелла). Закройте пробирки пробками, уравновесьте и осадите клетки центрифугированием при 6000 об/мин пять минут. Осторожно слейте надосадочную жидкость; добавив в каждую из пробирок по 3 мл свежeproкипяченной воды, ресуспендируйте осадок, после чего осторожно (не встряхивая) дополните пробирки свежeproкипяченной и остуженной водой до 50 мл. Еще одну пробирку заполните этой же водой. Все пробирки промаркируйте и плотно закройте крышками.

Возьмите одну пробирку с суспензией водорослей и поставьте под луч света от осветителя. Другую пробирку с суспензией водоросли поставьте под колпак из черной бумаги. Третью пробирку – под осветитель, снабженный светофильтром, позволяющим отделить свет дальней красной области спектра (более 720 нм). В четвертую добавьте диурон, таким образом, чтобы его концентрация в суспензии клеток *Chlorella* (хлорелла) составляла 10^{-4} М. А в пятую – такое же количество раствора 2,4-динитрофенола.

Пробирки, содержащие суспензию водорослей с диуроном и динитрофенолом, инкубируются совместно с первой на свету.

Во всех вариантах эксперимента суспензии инкубируются в течение 20 мин. По истечении указанного времени произведите осаждение клеток в режиме, описанном выше. Надосадочные жидкости осторожно (без взбалтывания) налейте в пробирки для сахарометрии. В такую же пробирку налейте и прокипяченную воду из пробирки для центрифугирования.

В каждую из пробирок добавьте по 0,5 мл раствора № 1. Раствор следует медленно добавлять из шприца, погрузив конец иглы в жидкость. Затем таким же образом добавьте 0,5 мл раствора № 2. Подождите три минуты до формирования образующегося осадка, а затем добавьте в каждую пробирку по 1 мл серной кислоты.

Титрование производится в стакане, в который выливается содержимое пробирки. Выделившийся иод окрашивает жидкости от светло-желтого до коричневого цвета (в зависимости от концентрации иода). Поэтому титрование тиосульфатом натрия первоначально производят до исчезновения окраски жидкости. Затем в стакан добавляется несколько капель крахмального раствора (до появления синей окраски), и титрование продолжается до исчезновения цвета. Записывается количество (в литрах) раствора тиосульфата натрия, пошедшее на титрование каждого варианта эксперимента (G). Результаты заносятся в таблицу записи результатов.

Задание

Вычислите скорость выделения кислорода клетками водоросли в каждом из вариантов эксперимента. Для этого определите количество кислорода, содержащегося в исходной воде ($[O_2]_g$) и вариантах экспериментальных сред ($[O_2]_i$), по формуле:

$$[O_2]_k(\text{моль}) = G_k \cdot 10^{-2}. \quad (1)$$

Затем определите скорость выделения кислорода в экспериментальных пробирках (V_{O_2}):

$$V_{O_2} = ([O_2]_i - [O_2]_g) / (t \rho 0,05), \quad (2)$$

где t – время инкубации суспензии клеток водоросли на свету; ρ – плотность суспензии (может определяться различными величинами (например, г сырой массы/л); $[O_2]_i$ и $[O_2]_g$ – содержание кислорода в суспензии клеток и в исходной воде.

Результаты занесите в таблицу. Сделайте заключение о влиянии освещения светом различной длины волны, динитрофенола

и диурона на фотосинтетическое выделение кислорода растениями. Сравните действие указанных веществ на продукцию кислорода и фиксацию CO_2 .

Таблица записи результатов

Вариант	$[\text{O}_2]_e$	$[\text{O}_2]_i$	t	V_{O_2}
Свет				
Темнота				
Дальний красный свет				
Диурон				
2,4-Динитрофенол				

Контрольные вопросы

1. Каковы общие физико-химические свойства разобщителей фосфорилирования?
2. Каким образом происходит фоторазложение воды?
3. Какую функциональную роль в растительном организме играет выделение кислорода при фотосинтезе?

Лабораторная работа 14

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА КЛЕТОК *CHLORELLA* (ХЛОРЕЛЛА) ИЗМЕРЕНИЕМ СКОРОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ O_2 ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Вводные замечания

В настоящее время определение содержания многих веществ в растворах осуществляется электрохимическими методами. Промышленностью выпускаются многочисленные приборы и датчики. Все известные конструкции электрохимических датчиков подразделяются по регистрируемым электрическим параметрам на потенциометрические, амперометрические, кулонометрические и кондуктометрические измерительные устройства. В целом различные типы электрохимических датчиков пригодны для определения содержания широкого круга химических соединений в жидкой и газообразной средах.

Ионоселективные электроды – это устройства, генерирующие потенциал (потенциометрические датчики), величина кото-

рого пропорциональна логарифму активности ионов. Примером такого датчика может служить стеклянный электрод, предназначенный для определения pH. pH-Метр – прибор, который вы можете встретить практически в любой лаборатории.

Основой действия амперометрических датчиков являются электрохимические реакции, протекающие на твердых проводниках. Любая окислительно-восстановительная реакция может протекать по химическому или электрохимическому механизмам. В первом случае для обмена электронами между окислителем (*Ox*) и восстановителем (*Red*) необходим непосредственный контакт. Во втором варианте окислитель и восстановитель пространственно разделены, а реакции протекают на границе раздела фаз электрод-электролит, при этом основная часть химической энергии преобразуется в электрическую.

В предлагаемой лабораторной работе оценка концентрации кислорода, растворенного в воде, осуществляется электрохимическим методом с помощью лабораторного кислородомера. Один из главных компонентов этого прибора – электрохимический датчик кислорода. Действие датчиков кислорода основано на электрохимической реакции восстановления кислорода:



Потенциал восстановления растворенного кислорода на твердых электродах лежит между $-0,5$ и $-0,9$ В относительно хлор-серебряного электрода.

Выпускаемые в настоящее время промышленностью электроды усовершенствованы. Катоды их изготавливаются из платины и золота, однако возможно также применение серебра и других благородных металлов. Наиболее распространены катоды из платины. Эти датчики представляют собой изолированную электрохимическую ячейку, отделенную от внешней среды газопроницаемой мембраной. Кислородные мембранные датчики обладают линейной зависимостью тока от концентрации кислорода. Благодаря защитной мембране датчики обладают исключительной селективностью.

Материалы и оборудование

Суспензия культуры водоросли *Chlorella* (хлорелла) известной плотности; свежепрокипяченная остуженная дистиллированная вода; секундомер; пробирки центрифужные с крышкой вместимостью 50 мл (2 шт.); стакан химический вместимостью 50 мл; центрифуга; осветитель для микроскопии; черная бумага; кислородомер лабораторный; штатив лабораторный.

Ход работы

Возьмите две чистые центрифужные пробирки. Налейте в одну из них 50 мл суспензии клеток культуры водоросли *Chlorella* (хлорелла), а во вторую такое же количество воды. Закройте пробирки пробками, уравновесьте и осадите клетки центрифугированием при 6000 об/мин 5 мин. Осторожно слейте надосадочную жидкость и, добавив 3 мл всежепрокипяченной воды, ресуспендируйте осадок, после чего осторожно (не встряхивая) дополните пробирку свежепрокипяченной и остуженной водой до 50 мл. Содержимое пробирки осторожно (без встряхивания) перенесите в чистый стакан и поставьте его на магнитную мешалку, предварительно погрузив в суспензию хлореллы магнитный брусок. Погрузите в стакан электрохимический датчик кислорода, подключенный к кислородомеру, а стакан с суспензией закройте черной бумагой. Схема установки изображена на рис. 4.

Включите кислородомер и магнитную мешалку. В течение 10–15 мин проследите динамику изменения содержания кислорода в суспензии клеток водоросли, записывая показания прибора через каждую минуту. После указанного периода снимите полоску черной бумаги со стакана и включите осветитель. Записывая показания кислородомера, определяйте концентрации O_2 ежеминутно в течение 20 мин.

По истечении указанного времени выключите осветитель, стакан закройте черной бумагой и вновь проследите динамику изменения содержания кислорода в суспензии клеток *Chlorella* (хлорелла).

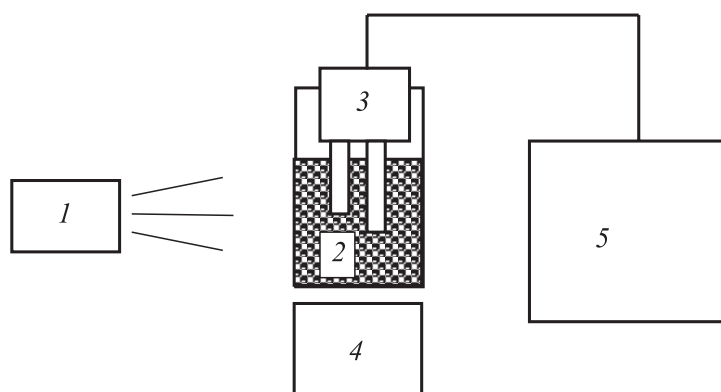


Рис. 4. Схема установки для определения интенсивности фотосинтеза суспензии *Chlorella* (хлорелла):

- 1 – осветитель; 2 – стакан с суспензией клеток *Chlorella* (хлорелла); 3 – электрохимический датчик кислорода; 4 – магнитная мешалка; 5 – кислородомер

Задание

Вычислите скорость выделения или поглощения кислорода клетками водоросли в каждом из вариантов эксперимента. Для этого пользуйтесь формулой

$$V_{O_2} = ([O_2]_i - [O_2]_0)/(t \rho),$$

где t – время инкубации суспензии клеток водоросли на свету; ρ – плотность суспензии (г сырой массы/л); $[O_2]_i$ и $[O_2]_0$ – концентрации кислорода (мг/л) в суспензии клеток через промежуток времени, равный t , и в начале измерения.

Результаты занесите в таблицу. Сделайте заключение о влиянии освещения на выделение кислорода растениями.

Таблица записи результатов

Вариант	$[O_2]_0$	$[O_2]_i$	t	V_{O_2}
Свет				
Темнота				

Контрольные вопросы

1. Почему можно определять интенсивность фотосинтеза по скорости выделения кислорода?
2. Образование на свету O_2 – окислительный или восстановительный процесс?
3. Укажите доноры и акцепторы электронов в процессе выделения кислорода растениями.

Лабораторная работа 15

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ХЛОРОПЛАСТОВ

Вводные замечания

Одним из главных показателей, характеризующих фотосинтетическую активность хлоропластов, является интенсивность процессов восстановления. В целом химические процессы окислительно-восстановительных реакций при фотосинтезе могут быть охарактеризованы схемой:



В этой системе в качестве донора электронов выступает вода, а акцепторами являются окисленные формы адениловых коферментов.

В реальных условиях представленная схема – комплекс окислительно-восстановительных реакций, протекающих на свету в хлоропластах в нативных растениях. Однако фотовосстановительная активность хлоропластов может быть оценена и в модельной системе. Дело в том, что хлоропласты относительно автономны и могут сохранять присущие им свойства некоторое время после их извлечения из клеток. В то же время в качестве акцепторов электронов могут выступать не только окисленные НАД, НАДФ или подобные им соединения, но и ряд других веществ, характеризующихся вполне определенными значениями окислительно-восстановительного потенциала.

В модельных системах удобно использовать в качестве акцепторов электронов такие вещества, которые в процессе восстановления меняют свои оптические свойства (например, феррицианиды, 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия и др.). Комплекс реакций фотовосстановления, связанных с фоторазложением воды и выделением кислорода, именуется *реакцией Хилла*. Предлагаемая лабораторная работа состоит из трех взаимосвязанных последовательных частей: выделения нативных хлоропластов, определения плотности суспензии хлоропластов и оценки скорости фотовосстановительных процессов.

Материалы и оборудование

Свежесрезанные листья растений; ножницы; охлажденные в холодильнике фарфоровые ступка с пестиком и чашка; охлажденные до 0 °С среды выделения хлоропластов (среда А) и хранения хлоропластов (среда Б); 10^{-4} М раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия; стакан химический вместимостью 50–10 мл; пробирки стеклянные (4 шт.); пробирки центрифужные (4 шт.);

центрифуга лабораторная; фотоколориметр или спектрофотометр; кюветы для фотоколориметра или спектрофотометра с оптической толщиной 1 см; светонепроницаемый колпак; осветитель; секундомер.

Ход работы

Получение препарата нативных хлоропластов. 5–7 г листьев измельчите ножницами и разотрите в охлажденной ступке с 10-кратным (по массе) количеством охлажденной среды выделения (среда А). Для лучшей гомогенизации среда А добавляется небольшими порциями. Полученный гомогенат отжимается через капроновую ткань (грубая фильтрация) в фарфоровую чашку, а затем переносится в пробирки для центрифугирования.

Уравновешенные пробирки поместите в центрифугу и осадите клеточные стенки, клетки, вакуоли и т. п. центрифугированием при 3000 g в течение 3 мин. Надосадочную жидкость перенесите в чистые пробирки и осадите хлоропласты центрифугированием в течение 10 мин при 3500 g. Осадок в пробирках представляет собой выделенные из клеток хлоропласты. Добавив в пробирки небольшое количество среды Б (5–15 мл), ресуспендируйте осадок и получите суспензию хлоропластов. Перенесите суспензию в мерный стакан и доведите объем взвеси до 50 мл средой Б. Поместите капельку суспензии под микроскоп и убедитесь, что в ней находятся хлоропласты.

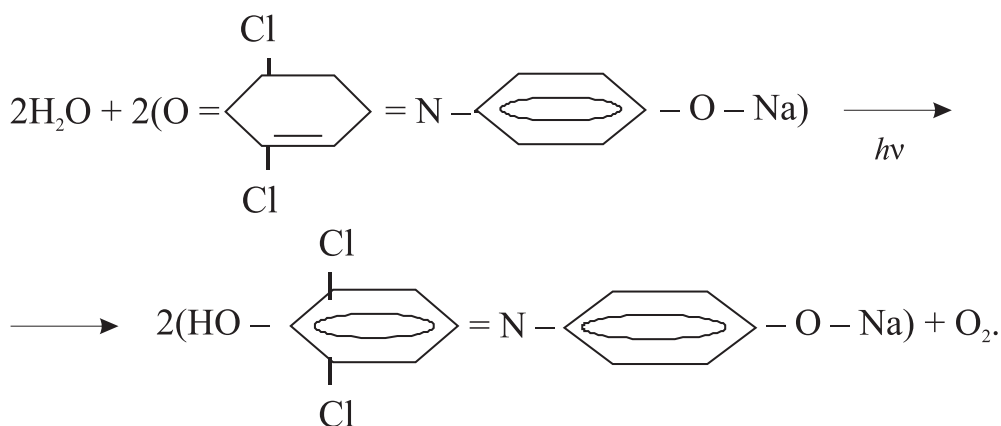
Определение плотности суспензии хлоропластов. Плотность суспензии хлоропластов (количество хлоропластов в единице объема, их масса в единице объема и т. п.) может быть оценена различными способами. В этом плане могут быть применены различные приспособления для подобной оценки. Часто оценивают плотность суспензии хлоропластов по количеству хлорофилла, содержащегося в единице объема суспензии. Содержание же пигмента в этом случае легко установить колориметрически или спектрофотометрически по оптической плотности суспензии при длинах волн, соответствующих поглощению хлорофилла.

Экспериментально установлено, что максимальная скорость реакции Хилла наблюдается при содержании хлорофилла в реакционной смеси около 20–60 мкг. Для достижения этого условия приготовьте суспензию хлоропластов, содержащую в 1 мл 10 мкг хлорофилла, путем разбавления полученной суспензии средой Б. Степень разбавления контролируйте по ее оптической

плотности в кювете с оптической толщиной 1 см при длине волны проходящего света 620 нм. Пользуйтесь колориметром или спектрофотометром. При содержании хлорофилла 10 мкг/см³ оптическая плотность суспензии будет равна 0,25. Колориметрические или спектрофотометрические измерения проводите относительно среды Б.

Определение активности реакции Хилла. В 4 пробирки налейте по 3 мл стандартизированной суспензии хлоропластов. В каждую из пробирок добавьте по 1 мл 10⁻⁴ М раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. Сразу же после добавления поместите все пробирки в темноту и поочередно определите оптическую плотность суспензии в каждой при длине волны 620 нм. Затем 2 пробирки оставьте под светонепроницаемым колпаком, а две другие поместите под осветитель на 5 мин.

Окисленная форма 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия характеризуется синей окраской, поглощающей красный свет, а при восстановлении этого соединения окраска теряется и растворы обесцвечиваются, т. е. их оптическая плотность, измеренная на длинах волн света красной части спектра, уменьшается:



Сразу же после инкубации пробирок на свету определите оптические плотности суспензий как опытных вариантов (выдержанных на свету), так и контрольных (находящихся в темноте).

Задание

Проведите эксперимент. Результаты занесите в таблицу. Сделав поправку на темновое восстановление 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, определите скорости реакции Хилла в пересчете на 1 ч выдержки суспензии на свету на 1 мг хлорофилла.

Таблица записи результатов

Варианты опыта	Оптические плотности растворов		Изменения оптической плотности		Изменения оптической плотности	
	до эксперимента	после эксперимента	за время эксперимента	с поправкой на темновое восстановление	за 1 ч	за 1 час на 1 мг хлорофилла
Свет						
Темнота						

Контрольные вопросы

1. Какие процессы именуется реакцией Хилла?
2. Какую роль играет фоторазложение воды при фотосинтезе?
3. Для чего при выполнении лабораторной работы применялся 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия?

ТЕМНОВАЯ СТАДИЯ ФОТОСИНТЕЗА

В биохимических превращениях, часто именуемых темновой стадией фотосинтеза, происходит ассимиляция углекислого газа, т. е. в хлоропластах синтезируются органические соединения из экзогенного CO_2 . Таким образом, убыль углекислоты из среды за счет ее поглощения растениями позволяет количественно определить интенсивность ассимиляции CO_2 . Термин «темновая стадия фотосинтеза» условно отображает реальный ход событий, происходящих в системе «среда – растение», и это, прежде всего, относится к процессу ассимиляции CO_2 растениями. У большинства растений (в том числе и у водоросли *Chlorella* (хлорелла)) ассимиляция CO_2 происходит именно на свету, поглощение же углекислого газа растениями в темноте отмечается только в некоторых случаях (например, это характерно для растений, обитающих в засушливых, жарких климатических условиях, у которых функционирует САМ-цикл). «Темновой» эта стадия именуется лишь потому, что для протекания биохимических превращений кванты света непосредственно не нужны.

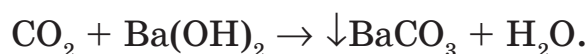
Интенсивность фотоассимиляционных процессов может быть определена не только по убыли углекислого газа из среды, но и по количеству образовавшихся органических веществ. В предлагаемых для выполнения лабораторных работах по данному разделу используются указанные подходы.

Лабораторная работа 16

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА ПО ПОГЛОЩЕНИЮ CO_2 В ЗАМКНУТОМ ПРОСТРАНСТВЕ

Вводные замечания

Метод основан на определении количества поглощенного листьями углекислого газа, находящегося в фиксированном объеме воздуха, заключенного в стеклянном сосуде. Исходно в воздухе находится небольшое количество углекислого газа (около 0,03 % по объему). Это количество CO_2 можно установить, связав CO_2 гидратом окиси бария:



В результате взаимодействия гидрата окиси бария с углекислым газом образуется нерастворимый осадок карбоната бария, а концентрация щелочи уменьшается. Количество CO_2 может быть определено по изменению содержания щелочи в растворе. Начальная и конечная концентрации гидрата окиси бария оцениваются титрометрически (например, титрованием раствором соляной кислоты стандартной концентрации).

При выполнении работы полагаем, что исходно в одинаковых объемах воздуха (т. е. в сосудах одинаковой вместимости) содержится равное количество углекислого газа. Таким образом, задача сводится к определению количеств углекислого газа, содержащегося в колбе без растений и колбе с растительным материалом после выдерживания последней на свету. Разница в содержании углекислоты между контрольным и опытным вариантами характеризует количество CO_2 , поглощенного в процессе видимого фотосинтеза.

Материалы и оборудование

Свежесрезанные листья растений; нить; 3 плоскодонные колбы вместимостью 1 л с резиновыми пробками; 0,02 N растворы гидрата окиси бария и соляной кислоты; раствор фенолфталеина; стаканы химические вместимостью 50 мл (3 шт.); бюретка; штатив лабораторный; светонепроницаемый колпак; осветитель; секундомер; маркер.

Ход работы

Возьмите три одинаковые колбы. Промаркируйте их. В две колбы поместите свежесрезанные листья растений, закрепив их одним концом нити за черешки, а другим – за пробку. Одну из этих колб поместите под светонепроницаемый колпак, а вторую – к осветителю. В третий сосуд листья не помещаются, она служит контролем для определения исходного содержания CO_2 в воздухе. Через 20–30 мин из сосудов извлеките листья растений, в каждую из 3 колб добавьте по 20 мл 0,02 N раствора гидрата окиси бария и по 3 капли раствора фенолфталеина (кислотно-основного индикатора). Колбы плотно закройте пробками. Для увеличения интенсивности поглощения углекислого газа растворы в колбах слегка встряхивайте в течение 20 мин. Затем оттитруйте содержимое каждой из 3 колб 0,02 N раство-

ром соляной кислоты. Титрование ведется до исчезновения розового окрашивания.

Задание

Проведите эксперименты. Результаты занесите в таблицу. Считая, что 1 мл 0,02 N раствора гидрата окиси бария может поглотить 0,44 мг CO_2 , определите количество углекислоты, поглощенной листьями растений в процессе инкубации на свету (Q):

$$Q = 0,44 (n_1 - n_2),$$

где n_1 и n_2 – количество кислоты, израсходованной на титрование исходного и экспериментального объема растворов барита.

Таблица записи результатов

Вариант опыта	Время инкубации, мин	Площадь поверхности листьев, дм^2	Количество HCl , израсходованное на титрование, мл		Количество CO_2 , поглощенное растением, мг	Интенсивность фотосинтеза, $\frac{\text{мг, CO}_2}{\text{мин} \cdot \text{дм}^2}$
			n_1	n_2		
Контроль						
Свет						
Темнота						

Контрольные вопросы

1. Для чего в процессах фотосинтеза используется CO_2 ?
2. Связана ли ассимиляция углекислоты с выделением кислорода?
3. Зависит ли интенсивность фотосинтетических процессов от концентрации углекислого газа в воздухе?

Лабораторная работа 17

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА ПО ПОГЛОЩЕНИЮ CO_2 В ТОКЕ ВОЗДУХА

Вводные замечания

Определение интенсивности процессов фотосинтеза в токе воздуха более всего подходит к оценке процессов, происходящих в реальных условиях. В отличие от замкнутого пространства в этом случае интенсивность ассимиляционных процессов не огра-

ничивается ни объемом, ни общим содержанием CO_2 . Наиболее приемлемым способом определения интенсивности процессов фотосинтеза в этих условиях является оценка скорости поглощения CO_2 из атмосферного воздуха растениями на свету.

CO_2 всегда присутствует в воздухе в небольших количествах. Считается, что его содержание в воздухе составляет приблизительно 0,03 % по объему, однако в каждом конкретном случае эта величина может колебаться в значительных пределах. Поэтому при определении интенсивности фотосинтетической ассимиляции углекислоты растениями необходимо учитывать реально существующую концентрацию CO_2 в воздухе.

Наиболее часто оценка интенсивности фотоассимиляционных процессов растений в токе воздуха проводится по убыли углекислоты. Предлагаемый способ определения величины убыли углекислого газа из воздуха основан на сравнении количества CO_2 в объеме исходного воздуха с таковым после прохождения этого воздуха над растениями или отдельными частями растения. Еще в конце XIX в. было предложено осуществлять оценку содержания CO_2 в воздухе по поглощению его растворами щелочей, а для осуществления этого использовать трубку Петенкоффера – стеклянный V-образный неравноплечный сосуд. В качестве поглотителей используются растворы гидратов окисей бария, натрия, калия и др. Количество же поглощенного CO_2 оценивается различными способами. Вам предлагается осуществить оценку количества поглощенного углекислого газа при прохождении воздуха через раствор щелочи титрометрически (в этом случае в качестве поглотителя используется раствор гидрата окиси бария) и кондуктометрически (поглощение углекислого газа осуществляется раствором NaOH). В последнем случае оценивается проводимость раствора поглотителя, которая меняется по мере уменьшения содержания в воде гидрата окиси натрия и увеличения концентрации карбоната натрия. Причем в известных пределах изменение электропроводности раствора щелочи пропорционально количеству поглощенной углекислоты.

Используемый при выполнении лабораторной работы прибор составлен по дифференциальной схеме: через две колонки с раствором поглотителя одновременно пропускаются одинаковые объемы воздуха. Но через первую колонку проходит просто воздух помещения, а через вторую – воздух, предварительно прошедший над листьями растения через листовую камеру. При оценке интенсивности фотосинтеза будем считать, что весь CO_2 поглощается в

растворе щелочи, а количество ассимилированной растениями углекислоты равно разнице между количеством CO_2 , содержащемся в исходном воздухе, и количеством CO_2 после прохождения его над растениями. Для осуществления этих условий скорость пропускания воздуха через поглотитель должна быть невысокой.

На рис. 5 представлена схема прибора. В сосуде (1) находится раствор щелочи. С помощью кранов (2) этот сосуд сообщается с поглотительными отсеками (3). Поглотительные отсеки представляют собой стеклянные трубки, закрытые сверху и снизу резиновыми пробками (4 и 5). В верхних пробках (4) имеется отверстие, в которое вставлена трубка, соединяющая поглотительный отсек с газольдером (6) – приспособлением для прокачивания дозированного количества воздуха.

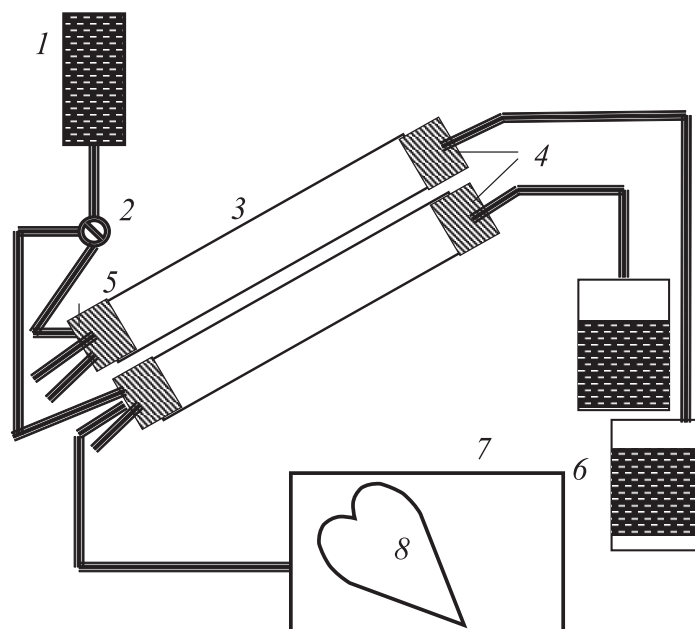


Рис. 5. Схема прибора для определения интенсивности фотосинтеза в токе воздуха:

- 1 – сосуд с раствором щелочи; 2 – кран;
 3 – поглотительные отсеки; 4, 5 – резиновые пробки; 6 – газольдеры; 7 – листовая камера;
 8 – лист растения

В нижних пробках имеются три отверстия с трубками: одно – для связи поглотительного отсека с емкостью, содержащей раствор щелочи, второе – для слива поглотителя, третье – для связи поглотительного отсека с листовой камерой или окружающей средой. Для регулирования потока жидкостей или газов в поглотительный отсек (или из него) трубки, проходящие через нижние пробки, снабжены зажимами.

Материалы и оборудование

Свежесрезанные листья растений; децимолярные растворы гидратов окисей бария и натрия и соляной кислоты; раствор фенолфталеина; стаканы химические вместимостью 50 мл (3 шт.); бюретка; штатив лабораторный; осветитель; секундомер.

Ход работы

Определитесь со способом регистрации количества поглощаемого щелочью углекислого газа. Если вы выбрали титрование, то заполните сосуд (1) раствором гидрата окиси бария, если кондуктометрию – гидратом окиси натрия.

Заполните поглотительные отсеки раствором щелочи до метки. Заполните газольдеры водой. Подключите газольдеры к поглотительным отсекам. Поместите лист в листовую камеру, а последнюю – под осветитель. Откройте краны газольдеров. Вытекающая вода создаст разрежение в поглотительных отсеках прибора. Осторожно регулируя рукоятки зажимов трубок, добейтесь просачивания пузырьков воздуха в поглотительные отсеки. Включите секундомер. Воздух не должен идти очень медленно, но и быстрый его проток тоже нежелателен, поэтому добейтесь того, чтобы пузырьки были выстроены в ряд с промежутками 0,5–1,0 см, а сами – не более 0,5 см в диаметре. Пропускайте воздух как через листовую камеру, так и через контрольный отсек поглотителя с приблизительно одинаковой скоростью. Поскольку идентичности в потоках воздуха добиться невозможно, необходимо ориентироваться на объем вышедшей из газольдеров воды: через оба поглотительных отсека должны быть пропущены одинаковые объемы воздуха.

По прошествии установленного времени экспозиции перекройте зажимами трубки, соединяющие поглотительные отсеки с листовой камерой и атмосферным воздухом, и только после этого отключите газольдеры, перекрыв краны для оттока воды и сняв резиновые пробки с поглотительных отсеков. Слейте растворы щелочей из поглотительных отсеков в заранее промаркированные стаканы.

Титрометрическое определение количества поглощенного CO_2 . В стаканы с гидратом окиси бария добавьте по 3–4 капли фенолфталеина и произведите титрование содержимого каждого из стаканов соляной кислотой до исчезновения окраски.

Кондуктометрическая оценка количества поглощенного CO_2 . Процедуры выполняются в соответствии с инструкцией к кондуктометру, поэтому во время экспозиции листьев в токе воздуха внимательно ознакомьтесь с инструкцией к прибору.

Задание

Проведите эксперименты. Результаты занесите в таблицу. Считая, что 1 мл 0,1 М раствора гидрата окиси бария может поглотить 4,4 мг CO_2 , определите количество углекислоты, поглощенной листьями растений в процессе инкубации на свету.

Таблица записи результатов

Вариант опыта	Время инкубации, мин	Площадь поверхности листьев, дм^2	Количество HCl , израсходованное на титрование поглотителя из контрольного отсека, мл	Количество HCl , израсходованное на титрование поглотителя из экспериментального отсека, мл	Количество CO_2 , поглощенное растением, мг	Интенсивность фотосинтеза, $\frac{\text{мг CO}_2}{\text{мин} \cdot \text{дм}^2}$
Свет						

Контрольные вопросы

1. В какое время суток растения поглощают CO_2 ?
2. Связана ли ассимиляция углекислоты с фотовосстановительной активностью?
3. Охарактеризуйте основные типы процессов ассимиляции углекислоты.

Лабораторная работа 18

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПРОЦЕССА ФИКСАЦИИ CO_2 КЛЕТКАМИ ВОДОРΟΣЛИ *CHLORELLA* (ХЛОРЕЛЛА) НА ОСНОВЕ РЕГИСТРАЦИИ ФОТОИНДУЦИРОВАННОГО СДВИГА pH

(выполняется вместе с лабораторной работой 10)

Вводные замечания

Одноклеточные зеленые водоросли довольно часто применялись ранее и используются сейчас для изучения процессов фотосинтеза в растениях. Уместно в этой связи упомянуть классические эксперименты Эмерсона и Арнольда, проведенные в 1932 г. с суспензиями водоросли *Chlorella* (хлорелла), которые проде-

монстрировали неодинаковую функциональную роль разных молекул хлорофилла фотосинтетического аппарата растений. Ввиду неприхотливости и простоты организации этих организмов их весьма удобно использовать для различного рода модельных экспериментов, посвященных физиологии и биохимии растительной клетки. Процессы фотосинтеза, происходящие в зеленых водорослях и высших растениях, схожи. Это относится как к световой стадии фотосинтеза, так и к его темновому этапу.

Напомним, что в биохимических превращениях, именуемых темновой стадией фотосинтеза, происходит ассимиляция углекислого газа, т. е. в хлоропластах синтезируются органические соединения из экзогенного CO_2 . Таким образом, убыль углекислоты из среды, в которой суспендированы водоросли, должна означать ассимиляцию CO_2 .

Поскольку углекислый газ, растворяясь в воде, образует угольную кислоту, это должно приводить к сдвигу рН:



Возможна и иная схема диссоциации угольной кислоты до карбонат-иона, однако этот процесс характерен лишь для щелочных сред. При значениях рН, близких к нейтральному, в растворах преобладают бикарбонат-ионы. Угольная кислота относится к слабым кислотам, поэтому степень диссоциации ее разбавленных растворов определяется в значительной мере концентрацией ионов H^+ , а в качестве коэффициента пропорциональности выступает константа равновесия K_a :

$$K_a^{\text{HCO}_3} = \{[\text{HCO}_3^-] \cdot [\text{H}^+]\} / [\text{CO}_2], \quad (2)$$

где $[\text{HCO}_3^-]$, $[\text{H}^+]$ и $[\text{CO}_2]$ – молярные концентрации бикарбонат-иона, иона водорода и углекислого газа соответственно. На практике удобнее пользоваться величинами $\text{pH} = -\lg [\text{H}^+]$ и $\text{p}K_a = -\lg [K_a] = 6,4$. В этом случае уравнение (2) преобразуется:

$$\text{pH} - \text{p}K_a^{\text{HCO}_3} = \lg [\text{HCO}_3^-] - \lg [\text{CO}_2]. \quad (3)$$

Растворимость CO_2 в воде достаточно высока, что, например, приводит к относительно низкому значению рН дистиллированной воды, хранящейся на воздухе. При удалении из нее углекислого газа значение рН возрастает. На этом явлении и основывается предлагаемый метод оценки скорости поглощения углекислого газа водными растениями в процессах фотосинтеза.

Исходно предполагается, что величина сдвига рН водной среды, содержащей водоросли, определяется лишь концентраци-

ей растворенного в ней CO_2 . В этом случае молярная концентрация CO_2 , растворенного в воде, может быть оценена по величине рН с учетом значения $\text{pK}_a^{\text{HCO}_3^-}$:

$$[\text{CO}_2]_{\text{общ}} = (10^{\text{pK}_a} + 10^{\text{pH}}) / 10^{2\text{pH}}. \quad (4)$$

Следует отметить, что в соответствии с формулой (4) концентрацию CO_2 можно определить весьма приближенно, поскольку при ее выводе не учитывалось ни влияние других факторов на величину показателя кислотности, ни буферная емкость воды.

Материалы и оборудование

Суспензия культуры водоросли *Chlorella* (хлорелла) известной плотности; секундомер; стакан химический вместимостью 50 мл; рН-метр; электроды для рН-метрии; магнитная мешалка, осветитель для микроскопии; черная бумага.

Ход работы

Налейте по 30 мл суспензии клеток культуры водоросли *Chlorella* (хлорелла) в стакан. Стакан с суспензией клеток водоросли поставьте на магнитную мешалку, предварительно положив в него магнитный брусок. Погрузите в стакан рН-метрические электроды и закройте сосуд полоской черной бумаги. Включите приборы (рН-метр и магнитную мешалку) и подождите 10 мин до установления показаний рН-метра. Запишите показания рН-метра (pH_0).

Удалите полоску черной бумаги со стакана, включите осветитель и секундомер. Через каждые 1–3 мин в течение 15 мин после начала освещения снимайте показания рН-метра (pH_t).

Задание

Пользуясь формулой (4), определите содержание CO_2 в среде суспензии до освещения культуры водоросли и через 10–15 мин после его начала. Вычислите скорость поглощения углекислого газа на свету клетками водоросли (Φ) по формуле

$$\Phi = ([\text{CO}_2]_0 - [\text{CO}_2]_t) / (t \rho), \quad (5)$$

где $[\text{CO}_2]_0$ – концентрация углекислого газа в среде до освещения; $[\text{CO}_2]_t$ – концентрация углекислого газа через 10–15 мин после начала освещения; t – время освещения культуры; ρ – плотность суспензии (мг сырой массы/л). Результаты занесите в таблицу.

Таблица записи результатов

pH_0	pH_t	$[\text{CO}_2]_0$	$[\text{CO}_2]_t$	t	Φ

Контрольные вопросы

1. Какие процессы происходят во время темновой стадии фотосинтеза?
2. Почему при освещении суспензии клеток водорослей увеличивается pH ?
3. Какую роль в планетарном масштабе играет фотоассимиляция CO_2 растениями?

Лабораторная работа 19

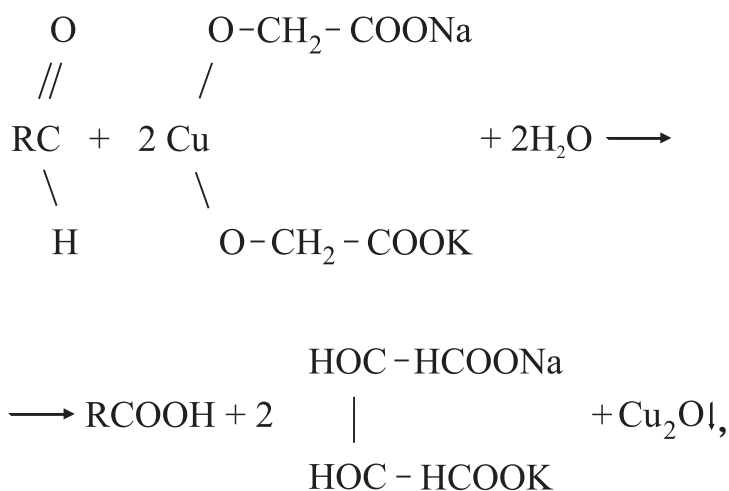
ДЕМОНСТРАЦИЯ НАКОПЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ

Вводные замечания

Из углекислого газа, поглощенного растениями при их освещении, синтезируются органические вещества. При этом происходит восстановление углерода. Процессы биосинтеза органических соединений весьма сложны и многостадийны, но в конечном итоге образуются вполне определенные соединения, которые накапливаются растениями и используются по мере надобности. Среди первичных продуктов фотоассимиляции CO_2 особое место занимают углеводы, а точнее моносахариды. Этим веществам отводится заметная роль как в процессах регенерации первичных акцепторов углекислоты в циклах биохимических превращений, связанных с непосредственной фиксацией CO_2 , так и в биосинтезе основных веществ, составляющих основу живого организма. Кроме того, углеводы (в виде моно-, ди- или полисахаридов) зачастую выступают в роли запасаемых веществ.

Некоторые растения (особенно лилейные: лук, чеснок, нарцисс, тюльпан, кливия, криниум и др.) накапливают значительное количество водорастворимых моно- и дисахаридов в листьях. Это не означает, что в указанных растениях вовсе не накапливаются полисахариды, синтез последних происходит обычно в подземных органах (луковицах) из водорастворимых моно- и дисахаридов, доставляемых туда флоэмным током. Обнаружить водорастворимые углеводы можно различными методами, но наиболее часто для этих целей используется реакция Фелинга.

В основу этой качественной реакции положено образование закиси меди при взаимодействии соединений двухвалентной меди с альдегидными и кетонными группами углеводов:



где $\text{R}-\text{CH}-\text{O}$ – моносахарид; RCOOH – карбоновая кислота, образующаяся в результате окисления моносахарида реактивом Фелинга.

Наличие закиси меди выявляется по характерному кирпично-красному цвету взвеси или осадка (в зависимости от количества углевода в анализируемой пробе), образующегося в ходе реакции. При этом количество закиси меди будет пропорционально содержанию углевода в анализируемой пробе. Количественное определение Cu_2O может быть осуществлено различными способами, например титрованием соляной кислотой, колориметрически и т. п.

Материалы и оборудование

Листья растений семейства лилейных, предварительно выдержанные в темноте и на свету; ножницы, фарфоровая ступка с пестиком; колбы конические вместимостью 100 мл (2 шт.); реактив Фелинга; этиловый спирт; спиртовой раствор иода; чашка Петри; водяная баня; пробирки стеклянные (3 шт.).

Ход работы

На образцах листьев сделайте «крахмальную пробу» (см. лабораторную работу 8), чтобы убедиться в отсутствии крахмала. Возьмите по 5 г листьев, выдержанных на свету и в темноте, каждую из навесок отдельно измельчите и разотрите в ступке. Растертую массу перенесите в колбу, добавьте 20 мл дистиллирован-

ной воды и поместите на 5 мин в кипящую водяную баню. Экстракты охладите и отфильтруйте. Пробы фильтратов объемом по 5 мл перенесите в пробирки, добавьте 5 мл реактива Фелинга и нагрейте до кипения. Наличие редуцирующих сахаров выявляется по появлению кирпично-красного осадка закиси меди. О содержании углеводов в пробе можно судить по количеству осадка.

Задание

Проведите реакцию на редуцирующие сахара в экстрактах листьев растений, предварительно выдержанных в темноте и на свету. Результаты занесите в таблицу. Сделайте заключение о содержании растворимых углеводов в каждом из вариантов.

Таблица записи результатов

Вариант	Степень проявления окраски	Выводы о содержании сахаров
Листья, выдержанные на свету		
Листья, выдержанные в темноте		

Контрольные вопросы

1. Какие первичные соединения синтезируются при темновой стадии фотосинтеза?
2. Какова роль фотосинтетического образования моно- и дисахаридов?
3. Почему глюкозу и некоторые другие углеводы называют редуцирующими сахарами?

Лабораторная работа 20

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОТОСИНТЕЗА ПО ОБРАЗОВАНИЮ КРАХМАЛА В ЛИСТЬЯХ

(выполняется совместно с лабораторной работой 11)

Вводные замечания

Крахмал – один из основных полисахаридов, запасаемых растениями. В некоторых растениях (пеларгония, колеус, хлорофитум и др.) синтез крахмала происходит в листьях. Этот полисахарид может быть легко обнаружен с помощью весьма чувствительной реакции с раствором иода в иодистом калии («крахмальная про-

ба»). При наличии крахмала появляется сине-фиолетовое окрашивание.

Однако появление окраски может быть «замаскировано» наличием пигментов фотосинтетического аппарата в листьях растений. Кроме того, амилолитические ферменты, всегда присутствующие в растительных клетках, способны разрушить крахмал, содержащийся в листьях. Поэтому на первом этапе работ необходимо инактивировать ферменты и удалить из листьев пигменты. Эти задачи решаются с помощью термической обработки листа и последующего растворения пигментов этиловым спиртом.

Поскольку крахмал относится к запасующим веществам, его количество в листьях должно быть непостоянным и зависеть от ряда факторов. При определенных условиях (например, в отсутствие освещения), когда расход полисахарида превышает его синтез, количество крахмала снижается. Поэтому для экспериментов листья пеларгонии срезают с растения, ставят черешками в воду и выдерживают в темноте 2 суток.

Материалы и оборудование

Стеклянные колпаки (2 шт.); стаканы химические вместимостью 50–100 мл (4 шт.); черная бумага с вырезанными на ней отверстиями в виде фигур или знаков; листья пеларгонии, предварительно выдержанные в темноте; мел; 10 % раствор HCl; 30 % раствор KOH; спирт этиловый 96 %; раствор I₂ в KI; чашки Петри (4 шт.); стеклянные пробирки (4 шт.); водяная баня; осветитель.

Ход работы

Возьмите пять листьев пеларгонии. Четыре листовые пластинки закройте экраном из черной бумаги с вырезанными на ней фигурами или знаками и поставьте в стаканы с водой (по 2 листа в каждый стакан). Один из стаканов поставьте под стеклянный колпак, в котором находится стакан с раствором едкого калия. Необходимость этого сосуда обусловлена тем, что углекислый газ, содержащийся в воздухе под колпаком, будет поглощаться щелочью. Таким образом будет создан дефицит CO₂ под колпаком. Другой стакан с листьями поместите под стеклянный колпак, где атмосфера обогащена CO₂. Для этого под колпак поместите ступку с растертым мелом, к которому добавлен 10 % раствор HCl. В результате взаимодействия веществ, согласно уравнению реакции



будет выделяться углекислый газ. Оба колпака с листьями поместите близко к осветителю на 1–2 ч.

С пятым листом для обнаружения в нем крахмала проведите «крахмальную пробу». Для этого опустите его на 2 мин в кипящую воду, а затем перенесите в стаканчик с 96 % этанолом и продолжите нагревание на водяной бане до полного обесцвечивания листьев (10–15 мин). Затем лист расправьте на чашке Петри и залейте холодной водой на 1–2 мин. После обработки воду слейте, а на поверхность обесцвеченного листа нанесите раствор йода в йодистом калии. О наличии крахмала судят по появлению фиолетового окрашивания.

По прошествии времени экспозиции листьев на свету проведите «крахмальную пробу» для каждого варианта опыта. Для процесса фотосинтеза необходим свет, поэтому фиолетовое окрашивание может наблюдаться только в незатемненных участках листа в виде так называемых «фигур Сакса».

Задание

Проведите определение наличия крахмала во всех листьях. Отметьте наличие или отсутствие реакции на крахмал в вариантах опыта. Результаты занесите в таблицу.

Таблица записи результатов

Вариант	Наличие реакции на крахмал
Листья, выдержанные в темноте	
Листья, экспонированные при дефиците CO_2	
Листья, экспонированные в атмосфере с CO_2	

При заполнении таблицы пользуйтесь следующими обозначениями:

- ++ ярко выраженная реакция на крахмал;
- + наличие реакции;
- +/- слабовидимая реакция на крахмал;
- отсутствие реакции.

Контрольные вопросы

1. Для чего растения накапливают крахмал?
2. Каким образом синтезируется крахмал в растениях?
3. Почему при дефиците углекислого газа синтез крахмала уменьшен?

СВЯЗЬ МЕЖДУ ТЕМНОВОЙ И СВЕТОВОЙ СТАДИЯМИ ФОТОСИНТЕЗА

Световая и темновая стадии процесса фотосинтеза протекают автономно, т. е. в модельных системах можно осуществить синтез АТФ и восстановление НАДФ без последующей ассимиляции CO_2 и сопутствующего ей синтеза органических соединений. Равно как возможны и процессы темновой фазы *in vitro* без участия света. Однако в нативных растениях эти стадии взаимозависимы.

Прежде всего, проявляется зависимость темновой стадии фотосинтеза с первичными фотохимическими процессами. Ведь именно световая стадия фотосинтеза обеспечивает энергозатраты и возможность восстановления неорганического углерода при последующих реакциях биосинтеза органических веществ. Предлагаемые для выполнения в этом разделе методических указаний лабораторные работы продемонстрируют связь темновой стадии фотосинтеза с фотохимическими процессами его световой стадии.

Лабораторная работа 21

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПРОЦЕССА ФИКСАЦИИ CO_2 КЛЕТКАМИ ВОДОРОСЛИ *CHLORELLA* (ХЛОРЕЛЛА) ПРИ НАРУШЕНИЯХ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ СВЕТОВОЙ СТАДИИ ФОТОСИНТЕЗА

Вводные замечания

В растениях процессы ассимиляции углекислого газа возможны лишь в том случае, если во время световой стадии фотосинтетического процесса синтезируется достаточное количество АТФ и происходит интенсивное восстановление НАДФ. Эти два компонента обеспечивают в дальнейшем биосинтез органических веществ из углекислого газа.

Синтез АТФ в хлоропластах осуществляется АТФ-синтетазой, расположенной на мембранах тилакоидов, за счет разности электрохимических потенциалов ионов H^+ , созданной работой электрон-транспортных цепей фотосинтетического аппарата. Таким образом, биосинтез АТФ осуществляется при функционировании как циклического, так и нециклического транспорта элек-

тронов. Восстановление же НАДФ в фотосинтетическом аппарате растений происходит только при функционировании нециклического транспорта электронов.

Работу цепи нециклического транспорта электронов можно нарушить различными способами. Напомним, что нециклический транспорт возможен лишь при функционировании обеих фотосистем. Поэтому, нарушив работу одной из них, можно ингибировать нециклический транспорт электронов. Проще всего это сделать, отключив фотосистему II при освещении растений светом дальней красной области спектра (около 720 нм). В этом случае хлорофилл реакционного центра фотосистемы I будет возбуждаться и осуществлять восстановление компонентов электрон-транспортной цепи, а фотосистема II не активирована. Возможен и иной подход – блокировать транспорт электронов от фотосистемы II к фотосистеме I с помощью специфических веществ. Такие соединения в настоящее время широко распространены и используются в качестве гербицидов (например, диурон, прометрин, симазин и т. п.).

Во всех предложенных вариантах нарушения транспорта электронов синтез АТФ должен по-прежнему происходить, поскольку функционирует цепь циклического транспорта электронов. В то же время возможно ингибирование биосинтеза АТФ без воздействия на процессы транспорта электронов в фотосинтетическом аппарате с помощью разобщителей фосфорилирования. Разобщители фосфорилирования почти не влияют на ход окислительно-восстановительных процессов электрон-транспортных цепей митохондрий и хлоропластов (иногда даже отмечается ускорение этих процессов). Нарушение процесса синтеза АТФ при действии разобщителей фосфорилирования происходит в результате снижения разности электрохимических потенциалов ионов водорода на энергосопрягающих мембранах. По химической структуре разобщители фосфорилирования весьма различаются между собой, однако все они являются слабыми электролитами. Причем их молекулы в неионизированной или как в ионизированной, так и в неионизированной формах липофильны. При воздействии разобщителей фосфорилирования восстановление НАДФ происходит, хотя биосинтез АТФ нарушен.

Эта лабораторная работа выполняется совместно с лабораторной работой 6 с использованием методики измерения концентраций CO_2 и формулы расчета интенсивности фотоассимиляции углекислоты.

Материалы и оборудование

Суспензия культуры водоросли *Chlorella* (хлорелла) известной плотности; секундомер; цилиндр мерный на 50 мл; стаканы химические вместимостью 50 мл (4 шт.); децимолярные растворы 2,4-динитрофенола, диурона, гидрата окиси натрия и соляной кислоты; микропипетка мерная (0,2 мл); груша резиновая; рН-метр; электроды для рН-метрии; магнитная мешалка; осветитель для микроскопии; черная бумага; красный светофильтр; светонепроницаемый колпак.

Ход работы

Возьмите четыре стеклянных стакана и промаркируйте их. Налейте по 30 мл суспензии хлореллы в каждый стакан. Один стакан поставьте на магнитную мешалку и произведите определение фотохимического сдвига рН, как описано в лабораторной работе 6.

Во второй стакан добавьте раствор 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ), а в третий – диурона таким образом, чтобы концентрация этих веществ в суспензии была 10^{-4} М. Проведите определение интенсивности поглощения CO_2 суспензиями, содержащими динитрофенол и диурон, таким же образом, как и в контрольном варианте.

Внимание! Поскольку расчет содержания CO_2 ведется по приближенной формуле, чтобы исключить влияние других факторов на величину рН, перед включением осветителя доведите рН-суспензии до темного уровня контрольного варианта опыта. Все стаканы, содержащие суспензию *Chlorella* (хлорелла), до проведения измерений рН хранятся под светонепроницаемым колпаком.

Регистрацию фотоиндуцированного сдвига рН в суспензии *Chlorella* (хлорелла), находящейся в четвертом стакане, производить, освещая ее светом дальней красной области спектра. Для этого на осветитель наденьте красный светофильтр.

Задание

Пользуясь инструкциями и формулами, содержащимися в лабораторной работе 6, определите содержание CO_2 в суспензии до освещения культуры водоросли и через 10–15 мин после его начала, вычислите скорость поглощения углекислого газа на све-

ту клетками водоросли в каждом из вариантов эксперимента. Результаты занесите в таблицу.

Таблица записи результатов

Вариант	pH ₀	pH _t	[CO ₂] ₀	[CO ₂] _t	t	Φ
Контроль						
Диурон						
Динитрофенол						
Красный свет						

Контрольные вопросы

1. Почему нарушение процессов световой фазы приводит к снижению фотоассимиляции CO₂?
2. Каков характер действия диурона?
3. Почему при освещении растений светом дальней красной области спектра фотосистема II не функционирует?

Лабораторная работа 22

СВЯЗЬ СИНТЕЗА ЗАПАСАЕМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ С ПРОЦЕССАМИ СВЕТОВОЙ СТАДИИ ФОТОСИНТЕЗА

Вводные замечания

Для образования органических веществ в процессе фотосинтеза необходима энергия, поставщиком которой является световая фаза фотосинтеза. При воздействии липофильных разобщителей фосфорилирования процессы транспорта электронов остаются неизменными, а тилакоидная мембрана становится проницаемой для ионов водорода, которые выходят из внутритилакоидного пространства, минуя АТФ-синтетазы, поскольку разобщитель встраивается в тилакоидную мембрану. Являясь ио-

нофором, он образует в мембране структуры, пропускающие ионы водорода. Таким со-единением является 2,4-динитрофенол.

Другой механизм разобщающего действия заключается в подщелачивании внутритилакоидного пространства. В этом случае мембрана тилакоида остается по-прежнему непроницаемой для ионов водорода, разности электрохимических потенциалов ионов водорода не создается. Подобным образом аммиак ингибирует синтез АТФ в хлоропластах и митохондриях. Являясь малой незаряженной молекулой, аммиак легко диффундирует через мембраны клетки, проникая, в том числе, и через тилакоидную мембрану. В кислой среде к молекулам аммиака (NH_3) присоединяются ионы водорода, превращая их в ионы аммония (NH_4^+), которые остаются заключенными внутри тилакоида, поскольку липидный бислой мембраны тилакоидов непроницаем для ионов. Таким образом, происходит подщелачивание внутритилакоидного содержимого и уравнивание концентраций ионов водорода по разные стороны мембраны.

В результате действия разобщителей фосфорилирования предотвращается и синтез органических соединений при неизменности протекания процессов восстановления в световой фазе.

Данная работа выполняется вместе с лабораторной работой 8, используя описание методики проведения «крахмальной пробы».

Материалы и оборудование

Стеклянные колпаки (3 шт.); стаканы химические вместимостью 50–100 мл (4 шт.); черная бумага с вырезанными на ней отверстиями в виде фигур или знаков; листья пеларгонии; предварительно выдержанные в темноте; листья пеларгонии; выдержанные в темноте в 10^{-4} М растворе динитрофенола; мел; 10 % раствор HCl ; аммиачная вода; спирт этиловый 96 %; раствор I_2 в KI ; чашки Петри (4 шт.); стеклянные пробирки (4 шт.); водяная баня; осветитель.

Ход работы

Листья пеларгонии срезают с растения, ставят черешками в воду и выдерживают в темноте в течение 2 суток. Несколько листьев помещают черешками в раствор 2,4-ДНФ ($5 \cdot 10^{-4}$ М) и также выдерживают в темноте 2 суток. Выдерживание листьев в темноте приводит к их обескрахмаливанию. При этом сахара, запасен-

ные в листьях, будут использоваться на процессы жизнедеятельности, и синтеза новых углеводов не будет наблюдаться.

Возьмите несколько листьев контрольной группы (без 2,4-ДНФ) непосредственно перед экспериментом и поместите в атмосферу, насыщенную парами аммиака (под стеклянный колпак, где находится стаканчик с раствором аммиака 10–25 %) на 10 мин.

Листовые пластинки (по 2 из контрольной и двух опытных групп растений) закройте экраном из черной бумаги с вырезанными на ней фигурами или знаками и поставьте в стаканы с водой. Для интенсификации процесса фотосинтеза листья помещают под колпак в атмосферу, обогащенную CO_2 .

Листья выдерживают на ярком свете в течение 2–3 ч, после чего делается крахмальная проба, как описано в лабораторной работе 8.

Задание

Проведите определение крахмала во всех листьях. Отметьте наличие или отсутствие реакции на крахмал в вариантах опыта. Результаты занесите в таблицу.

Таблица записи результатов

Вариант	Наличие реакции на крахмал
Контроль	
Обработка аммиаком (10 мин)	
Обработка 2,4-динитрофенолом (2 сут)	

При заполнении таблицы пользуйтесь следующими обозначениями:

- ++ ярко выраженная реакция на крахмал
- + наличие реакции
- +/- слабозаметная реакция на крахмал
- отсутствие реакции

Контрольные вопросы

1. Приведите дополнительные примеры разобщителей фосфорилирования.
2. Протекание каких процессов в клетке (кроме фотосинтеза) нарушается под действием разобщителей фосфорилирования?
3. Нарушится ли синтез углеводов под действием разобщителей фосфорилирования у C_4 и САМ-растений?

СОДЕРЖАНИЕ

Часть I. ПИГМЕНТЫ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ	3
ИЗВЛЕЧЕНИЕ ПИГМЕНТОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА	4
<i>Лабораторная работа 1. Получение фотосинтетических пигментов из растений.....</i>	<i>4</i>
<i>Лабораторная работа 2. Получение вытяжки каротина</i>	<i>6</i>
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ	8
<i>Лабораторная работа 3. Разделение пигментов по методу Крауса ..</i>	<i>11</i>
<i>Лабораторная работа 4. Омыление хлорофилла щелочью и отделение каротина.....</i>	<i>12</i>
<i>Лабораторная работа 5. Получение феофитина и обратное замещение водорода атомом металла.....</i>	<i>14</i>
<i>Лабораторная работа 6. Фотохимическая активность хлорофилла</i>	<i>16</i>
ОПТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХЛОРОФИЛЛА	19
<i>Лабораторная работа 7. Спектры поглощения фотосинтетических пигментов in vivo и in vitro</i>	<i>20</i>
<i>Лабораторная работа 8. Изучение флуоресценции растворов хлорофилла</i>	<i>22</i>
МЕТОДЫ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ПИГМЕНТОВ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ	27
<i>Лабораторная работа 9. Разделение фотосинтетических пигментов методом одномерной бумажной хроматографии</i>	<i>28</i>
<i>Лабораторная работа 10. Разделение пигментов с помощью колоночной хроматографии (по М. С. Цвету).....</i>	<i>31</i>
<i>Лабораторная работа 11. Определение содержания фотосинтетических пигментов в органах растений.....</i>	<i>33</i>
Часть II. БИОХИМИЯ ФОТОСИНТЕЗА.....	37
СВЕТОВАЯ СТАДИЯ ФОТОСИНТЕЗА.....	38
<i>Лабораторная работа 12. Обнаружение выделения кислорода растениями на свету (по методу Сапожникова)</i>	<i>39</i>

<i>Лабораторная работа 13.</i> Определение интенсивности выделения O_2 клетками водоросли <i>Chlorella</i> (хлорелла) на свету	41
<i>Лабораторная работа 14.</i> Определение интенсивности фотосинтеза клеток <i>Chlorella</i> (хлорелла) измерением скорости выделения O_2 электрохимическим методом.....	44
<i>Лабораторная работа 15.</i> Определение фотохимической активности хлоропластов.....	47
ТЕМНОВАЯ СТАДИЯ ФОТОСИНТЕЗА	52
<i>Лабораторная работа 16.</i> Определение интенсивности фотосинтеза по поглощению CO_2 в замкнутом пространстве	52
<i>Лабораторная работа 17.</i> Определение интенсивности фотосинтеза по поглощению CO_2 в токе воздуха.....	54
<i>Лабораторная работа 18.</i> Определение интенсивности процесса фиксации CO_2 клетками водоросли <i>Chlorella</i> (хлорелла) на основе регистрации фотоиндуцированного сдвига pH (выполняется вместе с лабораторной работой 10)	58
<i>Лабораторная работа 19.</i> Демонстрация накопления углеводов при фотосинтезе.....	61
<i>Лабораторная работа 20.</i> Определение фотосинтеза по образованию крахмала в листьях (выполняется совместно с лабораторной работой 11)	63
СВЯЗЬ МЕЖДУ ТЕМНОВОЙ И СВЕТОВОЙ СТАДИЯМИ ФОТОСИНТЕЗА.....	67
<i>Лабораторная работа 21.</i> Определение интенсивности процесса фиксации CO_2 клетками водоросли <i>Chlorella</i> (хлорелла) при нарушениях биохимических реакций световой стадии фотосинтеза	67
<i>Лабораторная работа 22.</i> Связь синтеза запасаемых полисахаридов с процессами световой стадии фотосинтеза.....	70

Учебное издание

**Кудряшов Анатолий Петрович,
Дитченко Татьяна Ивановна,
Молчан Олег Владимирович и др.**

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

**Лабораторный практикум
для студентов биологического факультета**

Редактор *Е. А. Логвинович*
Технический редактор *Г. М. Раманчук*
Корректор *Е. Д. Кукор*
Компьютерная верстка *Л. Л. Мартыновой*

Электронный ресурс 1,3 Мб
Режим доступа: <http://www.elib.bsu.by>, ограниченный
Дата доступа:

Белорусский государственный университет.
ЛИ № 02330/0494425 от 08.04.2009.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.