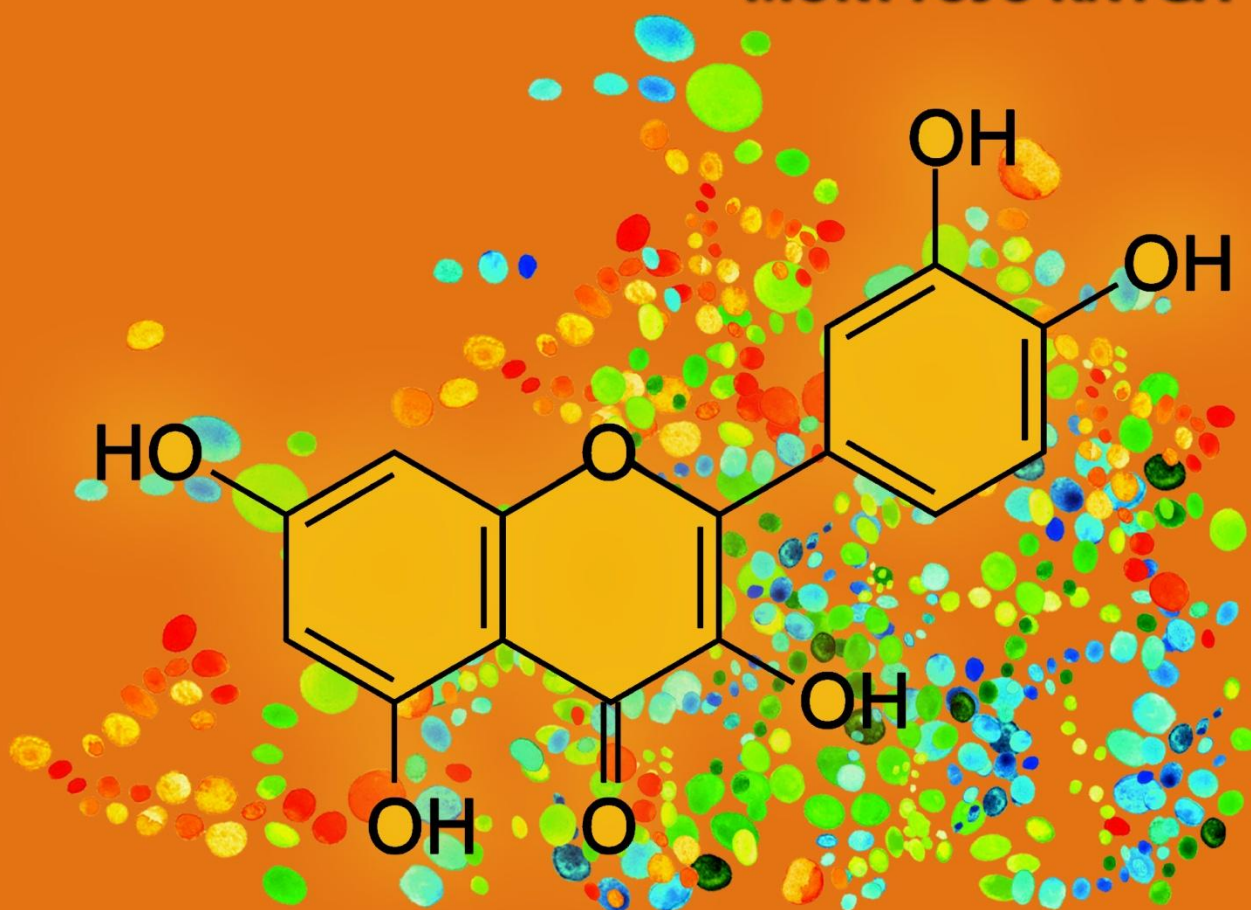


MOKYKLINIŲ CHEMIJOS EKSPERIMENTŲ TEORIJA IR PRAKTIKA

MOKYTOJO KNYGA





VYTAUTO DIDŽIOJO
UNIVERSITETAS
MCMXXII



LIETUVOS
EDUKOLOGIJOS
UNIVERSITETAS

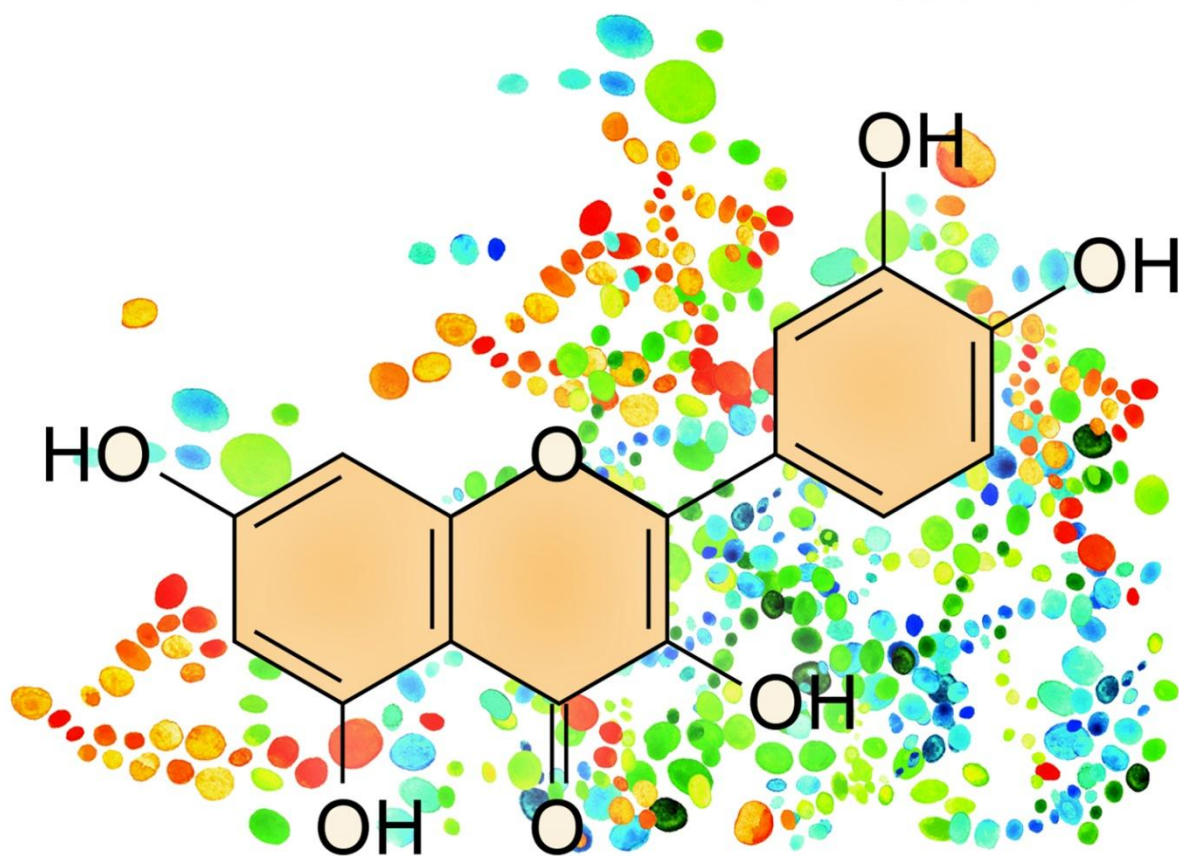


ŠIAULIŲ
UNIVERSITETAS

Vykintas Baublys, Regina Čekianienė, Audronė Gefenienė, Valdas Girdauskas,
Arvydas Kanapickas, Nerijus Lamanauskas, Saulius Mickevičius,
Palmira Pečiuliauskienė, Lina Ragelienė, Loreta Ragulienė, Jūratė Sitonytė,
Violeta Šlekienė, Mindaugas Tamošiūnas, Irena Vitėnienė, Raimundas Žaltauskas

MOKYKLINIŲ CHEMIJOS EKSPERIMENTŲ TEORIJA IR PRAKTIKA

MOKYTOJO KNYGA



Vilnius, 2014



VYTAUTO DIDŽIOJO
UNIVERSITETAS
MCMXXII



LIETUVOS
EDUKOLOGIJOS
UNIVERSITETAS



ŠIAULIŲ
UNIVERSITETAS

UDK 54(072)
Mo 53

2007–2013 m. Žmogiškųjų išteklių plėtros veiksmų programos 2 prioriteto „Mokymasis visą gyvenimą“ VP1-2.2-ŠMM-03-V priemonė „Mokymo personalo, dirbančio su lietuvių vaikais, gyvenančiais užsienyje, užsienio šalių piliečių vaikais, gyvenančiais Lietuvoje, ir kitų mokymosi poreikių turinčiais mokiniais, kompetencijų tobulinimas“ projektas „**Gamtos mokslų mokytojų eksperimentinės veiklos kompetencijos tobulinimas atnaujintų mokymo priemonių ir 9–12 klasių bendrųjų programų pagrindu (VP1-2.2-ŠMM-03-V-01-002)**“. Projekto vykdytojas – **Lietuvos edukologijos universitetas**. Partneriai – Vytauto Didžiojo universitetas ir Šiaulių universitetas.

Mokyklinių chemijos eksperimentų teorija ir praktika. Mokytojo knyga. Vilnius, 2014

Autoriai: Vyktintas Baublys¹, Regina Čekianienė², Audronė Gefenienė², Valdas Girdauskas¹, Arvydas Kanapickas¹, Nerijus Lamanas¹, Saulius Mickevičius¹, Palmira Pečiuliauskienė², Lina Ragelienė¹, Loreta Ragulienė³, Jūratė Sitonytė³, Violeta Šlekienė³, Mindaugas Tamošiūnas¹, Irena Vitėnienė², Raimundas Žaltauskas².

Metodinė priemonė apsvaistyta Lietuvos edukologijos universiteto Gamtos, matematikos ir technologijų fakulteto Tarybos posėdyje 2014-06-17 (protokolo Nr. 22).

Metodinę priemonę sudaro keturi skyriai. Pirmasis knygos skyrius yra teorinio pobūdžio, jame išryškintas pažinimo kompetencijos vaidmuo eksperimentinėje veikloje, nagrinėjamas tyrinėjimu grindžiamas mokymasis, aktyvieji mokymosi metodai, kurie galėtų pajvairinti edukacinę praktiką. Antrajame skyriuje aprašytos kompiuterizuotos mokymo sistemos, pritaikytos gamtamoksliams ugdymui. Trečiasis mokytojo knygos skyrius yra praktinio pobūdžio, susijęs su dalyko laboratoriniais darbais. Tyrimai laboratorijoje, konkrečios situacijos analizė, problemų sprendimas padeda nuo mokymo pereiti prie mokymosi, gamtos mokslus daro patrauklius, o patį mokymosi procesą įdomesnį ir prasmingesnį. Aprašomos tyrimų metodikos skiriasi tyrimo objektais, veiklų apimtimi ir sudėtingumu, todėl kiekvienas mokytojas, priklausomai nuo moksleivių pasirengimo lygio, gali pasirinkti tinkamus tyrimus. Ketvirtasis knygos skyrius yra praktinio tarpdalykinio pobūdžio. Šioje metodinėje priemonėje aprašytos metodikos yra išbandytos pedagogų kvalifikacijos tobulinimo kursuose su gamtos dalykų (biologijos, chemijos, fizikos) mokytojais. Mokymuose gamtamokslinę kompetenciją tobulino per 330 gamtos dalykų mokytojų, mokymų trukmė – 60 val.

Leidinio ekspertė – Regina Kaušienė.

¹ Vytauto Didžiojo universitetas

² Lietuvos edukologijos universitetas

³ Šiaulių universitetas

IV. TARPDALYKINIO TURINIO LABORATORINIAI DARBAI

4.1. BAKTERIJŲ BUVIMO NUSTATYMAS PAGAL JŲ GAMINAMŲ PORFIRINŲ SUGERTIES SPEKTRUS

Bendrosios programos:

Vidurinis ugdymas. Išplėstinis kursas. 11–12 klasės.

9. Šiuolaikiniai tyrimo metodai	
Nuostata Kūrybingai ir saugiai tyrinėti gamtos reiškinius.	
Esminis gebėjimas Apibūdinti chemijoje taikomus tyrimo metodus.	
Gebėjimai	Žinios ir supratimas
9.2. Apibūdinti medžiagų sandaros tyrimo metodus.	9.2.5. Pateikti pavyzdžių, kaip fizikiniai medžiagų tyrimo metodai taikomi praktikoje.

Bendrosios programos:

Vidurinis ugdymas. Biologija. Išplėstinis kursas. 11–12 klasės.

1. Metodologiniai biologijos klausimai	
Nuostata Įvairiais metodais tyrinėti biologinius reiškinius ir procesus.	
Esminis gebėjimas Analizuoti mokslinius metodus ir biologijos atradimų reikšmę.	
Gebėjimai	Žinios ir supratimas
1.3. Taikyti matematikos ir informacijos paieškos žinias ir gebėjimus tyrimų rezultatams apdoroti ir problemoms spręsti.	1.3.1. Tiksliai atlikti matavimus, apibendrinti ir pateikti gautus rezultatus. Apskaičiuoti procentus, vidurkius, santykius. Užrašyti gautus rezultatus, apdoroti juos statistikai ir pavaizduoti naudojantis kompiuterinėmis technologijomis.
5. Žmogaus sveikata	
Nuostata Saugoti savo ir kitų žmonių sveikatą.	
Esminis gebėjimas Paaikškinti aplinkos ir nuo žmogaus priklausančių veiksnių įtaką žmogaus sveikatai.	
Gebėjimai	Žinios ir supratimas
5.4. Apibūdinti, kaip žmogaus organizmas yra prisitaikęs apsisaugoti nuo žalingo mikroorganizmų poveikio, ir išvardyti profilaktikai naudojamas priemones.	5.4.2. Apibūdinti bakterijų dauginimuisi įtakos turinčius veiksnius. Nagrinėjant praktinius pavyzdžius aiškinti mikroorganizmų kultūrų auginimą ir panaudojimą biotechnologijose.
7. Evoliucija ir ekologija	
Nuostatos Suprasti, kad biologinę įvairovę lemia genai ir aplinka. Suvokti, kad gamta yra vientisa ir darniai veikianti sistema.	
Esminiai gebėjimai Apibūdinti paveldimąjį kintamumą, gamtinę atranką ir jos reikšmę evoliucijai. Apibūdinti organizmų sisteminimo reikšmę tyrinėjant gyvąją gamtą.	
Gebėjimai	Žinios ir supratimas
7.2. Paaikškinti, kad naujos rūšies atsiradimas yra evoliucijos	7.2.1. Apibūdinti rūšį kaip visumą individų, kurie gali gyventi tam tikromis aplinkos sąlygomis (rūšies

rezultatas.

ekologinėje nišoje), kryžmintis tarpusavyje ir palikti vaisingų palikuonių.

LABORATORINIO DARBO TEORINIS PAGRINDIMAS

Porfirinai priklauso heterociklinių aromatinių junginių klasei. Porfirino molekulės pagrindą sudaro keturi pirolo žiedai, sudaryti iš keturių anglies ir vieno azoto atomo, ir tarpusavyje sujungti metino tilteliais. Pavyzdžiui, kraujo hemo prekursoriaus protoporfirino IX molekulę sudaro tetrapirolinis žiedas, prie kurio šonų prisijungę -C₂H₃ (-vinilo), -CH₃ (-metilo), (-CH₂)₂COOH (-propionilo) radikalai (1A pav.). Porfirinai intensyviai sugeria šviesą mėlynojoje spektrinėje srityje. Intensyviausia protoporfirino IX sugerties juosta yra trumpųjų bangų srityje, kurios smailė lokalizuota ties 400 nm (1B pav.).

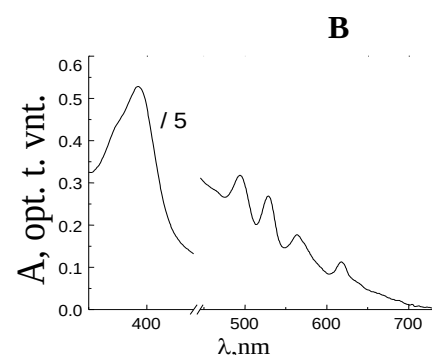
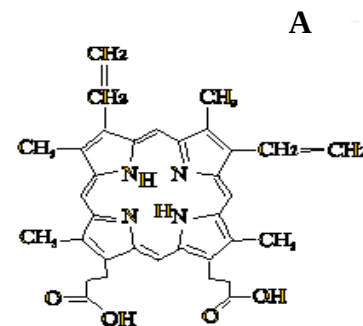
Endogeniniai porfirinai sėkmingai panaudojami sveikų ir bakterijų pažeistų audinių (uždegimo) diagnostikai. Pavyzdžiui, anaerobinės bakterijos *Propionibacterium acnes* gyvena ant gyvūnų odos ir normaliomis sąlygomis nėra kenksmingos. Tačiau kai kurie bakterijų štamai odoje sukeldami spuogus taip pat gamina ir endogeninius porfirinus, daugiausia protoporfirino IX. Spektroskopiniu metodu nustatius porfirinų kiekį odoje, galima įvertinti bakterijų gausą. Didelis bakterijų skaičius (daug porfirinų) rodo, kad vyksta uždegimas, kurį reikia gydyti. Šios bakterijos nėra vienintelė spuogų priežastis. Spuogai atsiranda užsikimšus riebalų liaukoms bei plaukų maišeliams. Spuogų atsiradimo priežastys gali būti įvairios: minėtas aukščiau bakterinis užkrėtimas, genetinės, hormoninės (paauglystės spuogai), psichologinės (dėl didelio streso ir galbūt priklauso nuo nepilnavertės mitybos).

Gyvūno, pavyzdžiui kiaulės, odą galima dirbtinai laikyti sąlygose, tinkamose šioms bakterijoms augti. Tokiu būdu išaugs daug bakterijų, jos gamins daug porfirinų, kuriuos bus galima aptikti kiaulės odoje, o taip pat ir odos mėginio inkubacijos terpėje (toliau – mėginio terpėje).

Šiame darbe naudodami sugerties spektroskopijos metodiką, atliksite tiriamojo audinio – kiaulės odos – mėginio inkubacijos terpės sugerties spektrų matavimus.

Porfirino nustatymui tirpale naudojamas fizikinis metodas vadinamas sugerties spektroskopija. Šviesai sklindant nevisiškai skaidria medžiaga, dalis šviesos yra sugeriama, todėl mažėja jos intensyvumas ir keičiasi spektrinė sudėtis. Šviesos intensyvumas rodo šviesos šaltinio skleidžiamą galią į tam tikrą ploto vienetą, o jo matavimo vienetas yra kandela (cd). Jei visų bangos ilgių šviesa sugeriama vienodai, tai tokia sugertis vadinama *paprastąja*. Paprastoji sugertis nekeičia šviesos spektrinės sudėties, tačiau keičia jos intensyvumą, kuris, sklindant medžiaga, palaipsniui mažėja. Jei skirtingo bangos ilgio šviesa sugeriama skirtingai, tada sugertis vadinama *atrankiąja*. Atrankioji sugertis keičia šviesos spektrinę sudėtį. Taip yra todėl, kad medžiagos atomai ir molekulės nevienodai sugeria skirtingo bangos ilgio šviesą. Dėl atrankiosios sugerties balta šviesa, praėjusi per medžiagos sluoksnį, tampa spalvota. Ištyrę per medžiagą praėjusios šviesos spektrinę sudėtį, galime nustatyti kokie atomai ir molekulės sudaro medžiagą, kokie procesai vyksta medžiagoje. Toks tyrimo metodas vadinamas *optine spektroskopija*.

Pagrindinį šviesos sugertį aprašantį dėsnį 1729 m. eksperimentiškai nustatė prancūzų mokslininkas P. Bugasas, o teoriškai 1760 m. pagrindė vokiečių mokslininkas J. Lambertas.



1 pav. Protoporfirino IX struktūrinė formulė (A) bei sugerties spektras (B) ($C = 1,16 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $l = 10$ mm tirpinta etanolyje).

1852 m. A. Beras tyrinėdamas šviesos sugertį tirpaluose pastebėjo, kad silpnųjų elektrolitų tirpalų monochromatinės šviesos sugerties koeficientas yra tiesiog proporcingas tirpalo koncentracijai:

$$I = I_0 e^{-k_\lambda \cdot c \cdot l}; \quad (1)$$

čia I yra perėjusios per medžiagą šviesos intensyvumas, kai kritusios šviesos intensyvumas buvo I_0 , e yra natūrinio logaritmo pagrindas, c yra tirpalo koncentracija, k_λ – molekulinis sugerties koeficientas, λ – šviesos bangos ilgis.

Atvirkščio dydžio pralaidumo faktoriui dešimtainis logaritmas yra vadinamas medžiagos sluoksnio *optiniu tankiu*: Atlikę matematinius pertvarkymus ir koncentracijos matavimo vienetais pasirinkę mol/l (M), gausime lygtį optiniam tankiui A skaičiuoti:

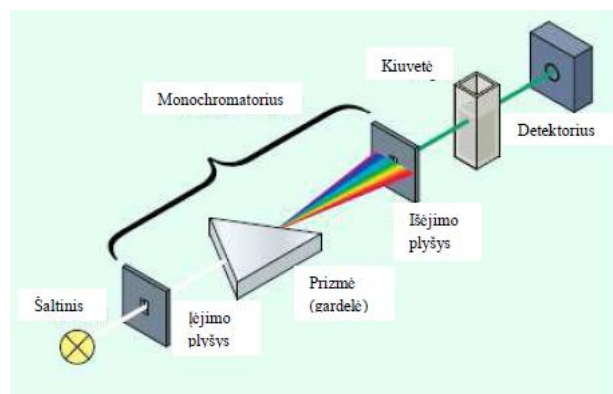
$$\lg \frac{I}{I_0} = -\lg T = \varepsilon \cdot c \cdot l = A; \quad (2)$$

čia ε – molinis sugerties koeficientas [$l / (\text{mol} \cdot \text{cm})$] arba [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$].

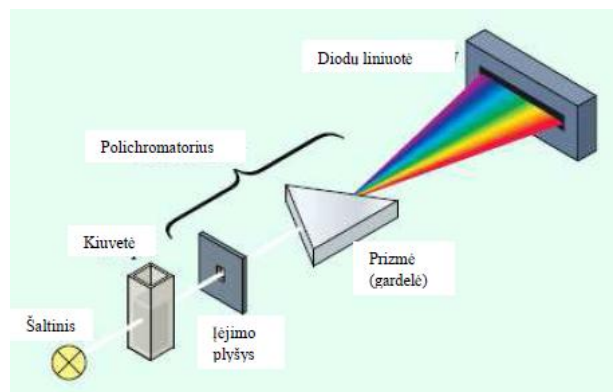
Galutinę lygtį, naudojama optiniam tankiui A skaičiuoti, yra ši:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (3)$$

Prietaisas skirtas šviesos spektrams registruoti vadinamas *spektrometru*. Standartinio spektrometro, skirto pralaidumo spektrams tirti, optinė schema pavaizduota 2 paveiksle. Pagrindiniai tokio spektrometro komponentai yra: plataus spektro šviesos šaltinis, monochromatorius, kiuvetė su tiriamu tirpalu ir šviesos intensyvumo detektorius. Monochromatorius yra skirtas iš plataus šviesos šaltinio spektro išskirti reikiamo bangos ilgio šviesą, kuri per galinį plyšį nukreipiama į tiriamą bandinį. Pagrindinis monochromatoriaus elementas yra prizmė arba difrakcinė gardelė, kuri išskleidžia baltą šviesą į spektrą. Sukant prizmę (difrakcinę gardelę) galima į išėjimo plyšį nukreipti reikiamo bangos ilgio baltos šviesos spektro dalį. Krentančios į kiuvetę ir praėjusios per kiuvetę šviesos intensyvumas, kurio vertė rodoma prietaiso ekrane arba su prietaisu sujungtame kompiuteryje, registruojamas detektoriumi. 2 paveiksle parodytu spektrometru kiekvieno laiko momentu registruojamas tik vieno bangos ilgio šviesos intensyvumas. Norint užregistruoti visą praėjusios šviesos spektrą, reikia keisti iš monochromatoriaus išeinančios šviesos bangos ilgį, ir atlikti matavimus iš eilės keletui bangos ilgių. Spektrometruose, kuriuose detektorius yra fotodiodų liniuotė, visas spektras registruojamas iš karto, kadangi į detektoriaus atskirus elementus patenka tiriamos šviesos spektro skirtingo bangos ilgio šviesa. Spektrometro su diodų liniuote optinė schema pavaizduota 3 paveiksle.



2 pav. Standartinio spektrometro optinė schema.



3 pav. Spektrometro su diodų liniuote optinė schema

Spektrometrijoje prietaisu matuojamas dydis yra santykis šviesos intensyvumo I , praėjusio per kiuvetę su tiriamuoju tirpalu, ir šviesos intensyvumo I_0 , praėjusio per tokią pat kiuvetę su tirpikliu. Įprasta, kad prietaisas perskaičiuoja gautą vertę, pateikdamas rezultatą kaip optinį tankį A . Toks pakeitimas yra prasmingas, nes, optinis tankis yra adityvus dydis: dviejų tirpalų mišinio optinis tankis lygus sumai kiekvieno mišinio optinių tankių:

$$A_{1+2} = A_1 + A_2 \quad (4)$$

LABORATORINIO DARBO METODIKA

Laboratorinis darbas atliekamas **II lygmeniu**, kaip struktūruotas tyrinėjimas. Mokiniam pateikiama nuosekli darbo eiga bei tyrimui atlikti skirtų priemonių sąrašas. Remdamiesi iškeltu tikslu bei dirbdami pagal pateiktą darbo aprašą, mokiniai patikrina suformuluotą hipotezę.

Eksperimentas atliekamas naudojant kompiuterinę mokymo sistemą Xplorer GLX (toliau GLX) bei jutiklį – spektrometrą. Mokiniai susipažįsta su spektrometro veikimo principu ir jo naudojimu. Atlikę sugerties spektrų matavimus geba įvertinti bakterijų buvimą ant odos paviršiaus. Iš sugerties spektrų mokiniai gebės nustatyti porfirinų koncentraciją tiriamajame mėginyje.

Kadangi eksperimento rezultatai mokiniam nėra iš anksto žinomi, atsiranda galimybė diskusijai grupėse. Rezultatų analizė ir aptarimas gali būti atliekami grupelėmis po 3–5 mokinius. Taupant pamokos laiką, siūloma kiekvienai grupei tirti odos gabaliukus, laikytus skirtingomis sąlygomis, o darbo rezultatus aptarti ir apibendrinti bei suformuluoti išvadas bendrai.

Šį laboratorinį darbą galima atlikti kaip IV lygmens tyrinėjimą. Jį galima siūlyti kaip baigiamąjį tiriamąjį darbą arba kaip projektinį darbą suformuluojant tyrimo problemą.

EKSPERIMENTAS

Tyrimo problema. Kaip nustatyti, ar yra bakterijų ant odos paviršiaus ir kiek.

Eksperimento tikslas – spektrometru nustatyti, ar yra bakterijų ant odos paviršiaus.

Tyrimo hipotezė. Odą laikant aplinkoje, tinkamoje bakterijoms augti, bakterijų turėtų išaugti daugiau negu aplinkoje, nepalankioje bakterijų dauginimuisi.

Laukiami rezultatai:

- Išmoks naudotis spektrometru.
- Išmoks matuoti tirpalų sugerties spektrus.
- Gebės spektrometru išmatuoti porfirinų koncentraciją mėginio inkubacijos terpėje.
- Palygins bakterijų susintetintų porfirinų koncentraciją, kai oda laikoma skirtingose inkubacijos terpėse (vandenyje, etanolyje, kosmetiniame valiklyje, NaCl tirpale).

Eksperimento priemonės ir reagentai:

- Xplorer GLX;
- UV-VIS spektrofotometras „Ocean Optics Red Tide USB 650“;
- $l = 1$ cm optinio kelio kiuvetės;
- Gyvūno (pvz., kiaulės) odos gabalėliai;
- Cheminės stiklinės;
- Pipetė (1 ml);
- Matavimo cilindras (iki 100 ml);
- Svarstyklės;
- Distiliuotas vanduo;
- 5, 10, 15 ir 20% NaCl tirpalas;
- Kosmetinis odos valiklis;
- Etanolis.

Darbo eiga

Darbo užduotys:

1. Paruošti odos mėginius.
2. Odos mėginius paveikti i) priemonėmis, stabdančiomis bakterijų augimą; ir ii) distiliuotu vandeniu.
3. Paruošti darbui spektrometrą.
4. Išmokti dirbti su spektrometru, užregistruoti sugerties spektrus.
5. Išmatuoti visų odos mėginių inkubacijos terpės sugertį praėjus 24–48 val po inkubacijos.
6. Išmokti grafiškai pateikti / atvaizduoti tirtų mėginių sugerties spektrus.
7. Grafike atpažinti biologinių chromoforų – tarp jų ir endogeninių porfirinų – sugerties juostas.
8. Išmokti nustatyti endogeninių porfirinų sugerties maksimumo bangos ilgį.
9. Palyginti skirtingų odos mėginių inkubacijos terpės sugertį: i) endogeninių porfirinų sugerties intensyvumą; ii) kitų endogeninių chromoforų sugerties juostų intensyvumą.

1. Odos mėginių paruošimas.

- 1.1. Pasigaminkite $w(\%) = 5\%$, 10% , 15% ir 20% NaCl (valgomosios druskos) tirpalus. Procentinė koncentracija w parodo, kiek gramų ištirpusios druskos yra šimte gramų tirpalo (tirpinio + tirpiklio).

$$w(\%) = \frac{m_{\text{tirpinio}}}{m_{\text{tirpalo}}} \times 100\% = \frac{m_{\text{tirpinio}}}{m_{\text{tirpinio}} + m_{\text{tirpiklio}}} \times 100\% \quad (5)$$

Druskos tirpiklis – distiliuotas vanduo. 1 lentelėje pateikiama sausos druskos masė ir distiliuoto vandens tūris, reikalingas atitinkamam procentinės koncentracijos w tirpalui pagaminti.

1 lentelė

NaCl masė ir distiliuoto vandens tūris, reikalingas tirpalams pagaminti.

$w, \%$	Tirpinio (druskos) masė g	Tirpiklio (distiliuoto vandens) tūris, ml
5	5	95
10	10	90
15	15	85
20	20	80

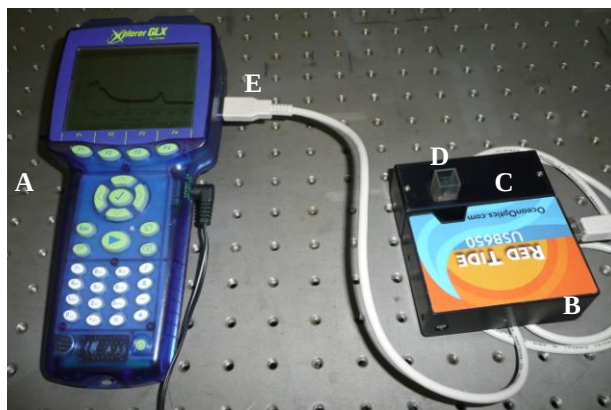
Druskos tirpalų gamyba.

- 1.1.1. Pasverkite 5 g druskos.
- 1.1.2. Druską supilkite į 100 ml talpos stiklinę.
- 1.1.3. Matavimo cilindru pamatuokite 95 ml distiliuoto vandens ir įpilkite į stiklinę su druska.
- 1.1.4. Stikline lazdele išmaišykite stiklinės turinį.
- 1.1.5. Tokiu pat eiliškumu pagaminkite ir kitus 10% , 15% ir 20% druskos tirpalus.
- 1.2. Tiriamąją kiaulės odos dalį supjaustykite į septynis vienodo dydžio ($\sim 3 \times 3 \text{ cm}^2$) mėginius.
- 1.3. Į pirmą cheminę stiklinę įpilkite 50 ml distiliuoto vandens; į antrą – 50 ml etanolio, į trečią – 50 ml pasirinkto kosmetikos valiklio, į 4, 5, 6 ir 7-tąją stiklines – atitinkamai po 50 ml 5% , 10% , 15% ir 20% NaCl tirpalus. Pažymėkite / sunumeruokite stiklines.
- 1.4. Odos gabalėlius pamerkite į tirpalą. Į kiekvieną stiklinę įdėkite po vieną odos mėginį. Odos mėginys turi būti gerai apsemtas skysčiu. Mėginius laikykite užsukame inde, kadangi jis turės specifinį blogą kvapą dėl joje esančių amoniako darinių – aminių.
- 1.5. Odos mėginius laikykite 24–48 val. $20\text{--}24^\circ\text{C}$ temperatūroje.

- 1.6. Jei mėginiai neskaidrūs, juos nufiltruokite. Filtravimui paruošiama kita stiklinė, į kurią įstatomas piltuvėlis su filtravimo popieriumi, sudrėkintu ekstrahavimui naudotu tirpikliu. Į paruoštą stiklinę su piltuvėliu pilamas tirpalas.

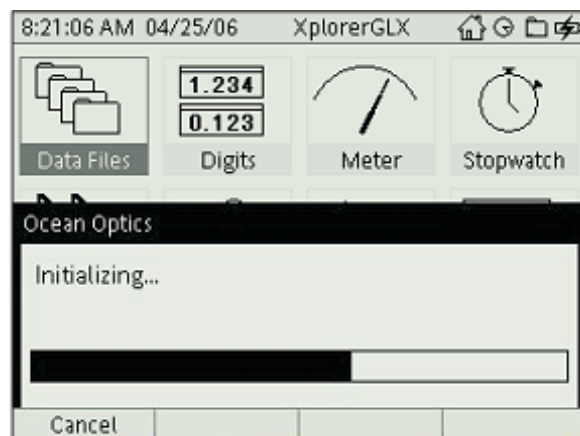
2. Aparatūros sujungimas ir testavimas.

- 2.1. Sujunkite aparatūrą, kaip pavaizduota 4 paveiksle: įjunkite GLX paspausdami (⏻) mygtuką prietaiso dešinėje, apačioje. USB laidu prijunkite spektrometrą prie GLX. Prijunkite maitinimo bloką, kai GLX programa aptinka Ocean Optics spektrometrą.



4 pav. Spektrometro instaliavimo langas

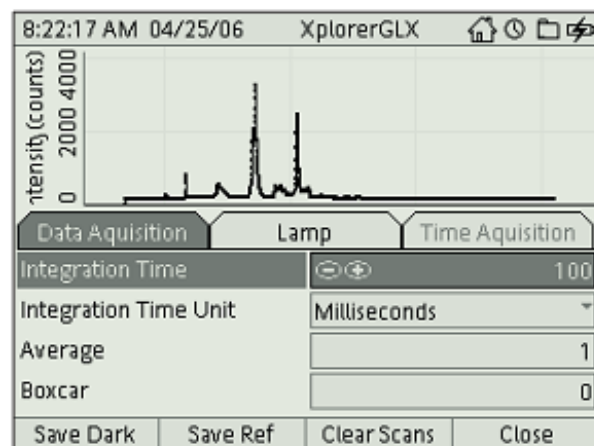
- 2.2. GLX reikalauja specialios licencijos darbui su Ocean Optics spektrometru. Įdiegus licenziją, jos įdiegti kiekvieną kartą dirbant su spektrometru nereikia. Licenzija, įrašyta USB atmintinėje, pateikiama kartu su spektrometru. Licenzijos įdiegimas: USB atmintinę, kurioje įrašytas licenzijos failas, prijunkite prie GLX; ekrane pasirodys užrašas „Čia yra Ocean Optics licenzija. Ar norėtumėte ją įdiegti?“ (*There is a license available for 'Ocean Optics Spectrometer. Would you like to add a license to this GLX?*). Sutikdami spauskite (F1). Ekrane atsiras žinutė: „Sėkmingai įdiegta licenzija“ (*Successfully added license for Ocean Optics Spectrometer*). Dar kartą paspauskite (F1). Prijungus spektrometrą, įsižiebia šviesos šaltinis ir atsiranda instaliavimo langas (*Ocean Optics Initializing...*) (5 pav.). GLX spektrometrą atpažįsta automatiškai. Po kelių sekundžių spektrometras paruoštas darbui.



5 pav. Spektrometro Analysis Configuration režimas.

- 2.3. GLX ekrane atsiranda spektrometro „Nustatymai“ (*Analysis Configuration*) režimas (6 pav.).
- 2.4. Paspauskite varnelę (☑), kai pažymėta „Integravimo laikas“ (*Integration time*) ir nustatykite 15 ms. Paspaudus varnelę dar kartą, reikšmė užfiksuojama.
- 2.5. Paspauskite varnelę, kai pažymėta „Vidurkis“ (*Average*) ir nustatykite 5.

- 2.6. Rodykle į dešinę () nueikite į lempą „Lempa“ (Lamp).
- 2.7. Varnelės pagalba nustatykite, kad pirmose dviejose eilutėse parodytos lempos būtų įjungtos (ON).
- 2.8. Į spektroskopo angą įdėkite juodą kiuvetę ir paspauskite mygtuką F1, „Išsaugoti tamsų“ (Save dark) (Pav. 6).
- 2.9. Įpilkite į matavimo kiuvetę 1 ml tirpiklio (70 % etanolio). Reikia pilti tokio tirpiklio, kuriuo buvo užpilti odos mėginiai.
- 2.10. Išimkite juodą kiuvetę ir įdėkite kiuvetę su etanolium. Kiuvetę reikia dėti taip, kad skaidri sienelė būtų atkreipta į lempą (Pav. 7).



6 pav. Spektrometro „Nustatymai“ (Analysis Configuration) režimas.

- Šiuo atveju šviesos kelio ilgis l yra lygus 1 cm. Jei kiuvetę įdėtumėte plokštuma a atgręžta į lempą, l bus lygus 0,5 cm. Atitinkamai gautą optinio tankio vertę reikės padauginti iš 2.
- 2.11. Paspauskite F2, „Išsaugoti atraminį signalą“ (Save ref) (Pav. 6).
- 2.12. Paspauskite F4, „Uždaryti“ (Close) ir uždarysite langą.
- 2.13. Mygtukais F1 ir F2 sukalibravote spektroskopą. Jei matavimų metu signalo nėra ar iškilo kita

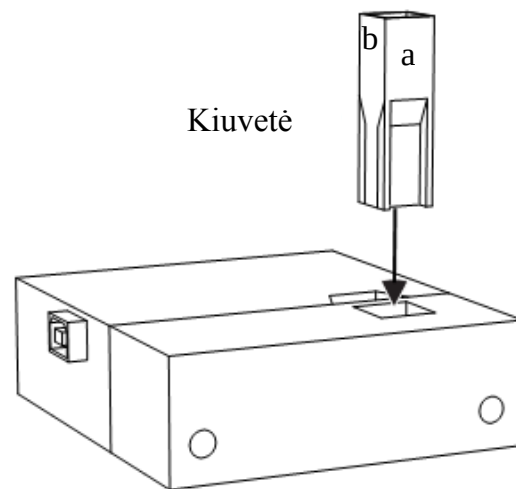
problema, spauskite , „Išvalyti“ (Clear Scan), kad viską išvalytumėte. Kalibruokite iš naujo.

- 2.14. Darbo metu norėdami dar kartą patekti į spektrometro Nustatymus (Analysis Configuration) režimą:

spauskite  + , atsiranda „Grafinio atvaizdavimo“ langas.

Spauskite , ir atidarykite „Įrankius“ (Tools).

Naudodami rodyklinius klavišus eikite žemyn ir pasirinkite „Spektro analizės konfigūracija“ (Spectrum Analysis Config) ir spauskite varnelę .



7 pav. Kiuvetės padėtis spektrometre.

3. Mėginių spektro matavimas

- 3.1. Paspaudus F4, automatiškai atsiranda grafinio vaizdo (Graph screen) atvaizdavimo langas. Tai pagrindinis jūsų darbo langas, kuriame galėsite matuoti tirpalų pralaidumo spektrus.
- 3.2. Du kartus paspauskite varnelę  ir rodyklių pagalba nustatykite, kad Y ašyje rodytų pralaidumą (Transmission).
- 3.3. Spauskite , ir bus matuojamas spektras.

- 3.4. Dar kartą spauskite , kad sustabdytumėte matavimą.
- 3.5. Norėdami išdidinti dominančią spektro dalį (400 – 500 nm), spauskite F2, reiškiantį „Skalė / patraukti“ (*Scale / Move*).

Rodyklėmis



spektrą

išdidinkite.

- 3.6. Norėdami reikiamą spektro dalį pastumti į ekrano vidurį, antrą kartą spauskite F2 ir rodyklėmis spektrą pastumkite, kur reikia.

- 3.7. Paspauskite F3, „Įrankiai“ (*Tools*) ir išsirinkę „Protingi įrankiai“ (*Smart tools*), paspauskite varnelę .

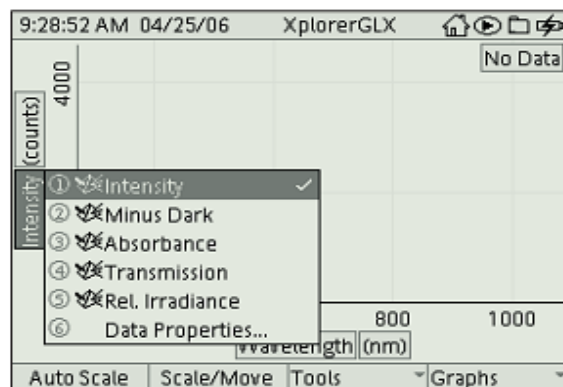
Rodyklėmis



nueikite ant dominančio spektro smailės (tarkim 415 nm), ir ekrane matysite optinio tankio vertę.

Skirtingų mėginių optinio tankio vertes užsirašykite. Pagal tai galima spręsti, kokiomis sąlygomis bakterijos auga ir gamina porfirinus, o kokiomis žūna ir porfirinų negamina.

- 3.8. Išmatuota sugertis *A* (matuojama optinio tankio vienetais) turi neviršyti 1.2. Jei yra daugiau, mėginį reikia skiesti. Tarkim, gavome kad *A* yra 4. Mėginį reikės skiesti 4 kartus: paimti 1 dalį turimo mėginio ir į jį įpilti 3 dalis tirpiklio (etanolio).



8 pav. Matavimų režimo grafinis langas.

Atsiras rutuliukas, rodantis X ir Y vertes.

4. *Rezultatų analizė.*

9 paveiksle pateiktos odos mėginių, inkubuotų etanolyje (a) ir vandenyje (b), nuotraukos. Palyginkime šių mėginių terpės sugerties spektrus.

Kiekybiškai palyginus porfirinų koncentraciją, gavome, jog porfirinų daugiausia yra distiliuotame vandenyje, o kosmetiniame valiklyje ar etanolyje – mažiau (2 lentelė). Taip pat didesnės koncentracijos NaCl tirpale porfirinų yra mažiau nei mažos koncentracijos NaCl tirpale. Galime teigti, kad porfirinus pagamina bakterijos, esančios kiaulės odos mėginyje. Todėl iš spektrinių rezultatų (tikriausiai ir iš mėginio kvapo) galime spręsti apie didelę bakterijų koncentraciją distiliuotame vandenyje inkubuotame kiaulės odos mėginyje. Valgomoji druska taip pat yra priemonė, apsauganti nuo bakterijų dauginimosi ir porfirinų gamybos. Būtent todėl vienas iš mėsos apdorojimo būdų yra jos sūdymas.

Pagal spektro formą išmatuotų odos mėginių terpės sugerties spektrai yra panašūs 330–400 nm (UV) ir 600–800 nm (raudonojoje) spektrinėje srityje. Plačias sugerties juostas UV spektrinėje srityje galima priskirti odos lipopigmentų ar baltymų sugerčiai. Raudonojoje spektrinėje srityje odos mėginių terpės sugerties juostų intensyvumas mažėja ir ties 800 nm tampa lygus nuliui. Tačiau palyginus odos mėginių inkubuotų etanolyje (spirite) ir vandenyje sugertį regimojoje spektrinėje srityje matyti, kad vandenyje yra ištirpęs chromoforas, pasižymintis intensyvia sugerties juosta ties 415 nm ir silpniau išreikštomis sugerties juostomis ties 535 ir 571 nm (10 pav.), kurios priskiriamos kraujo gamybos metu susidarantiems tarpiniams produktams. Galime daryti išvadą, kad 415 nm bangos ilgio smailė rodo porfirinų buvimą tirpale.



9 pav. Odos mėginiai, po inkubacijos etanolyje (a) ir distiliuotame vandenyje (b).

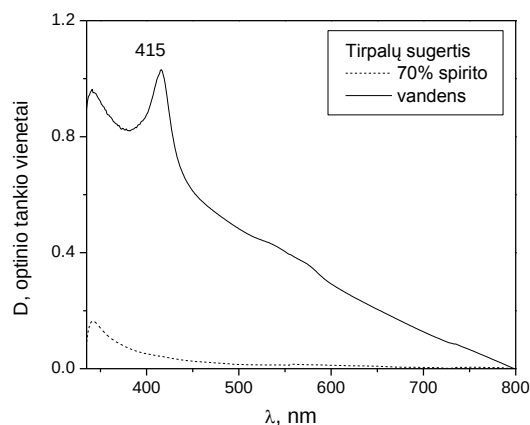
Odos apdorojimo terpės mėginių spektrinių matavimų rezultatai.

	Inkubacijos trukmė	1 val.		24 val.	
Eil. Nr.	Tiriamasis tirpalas	Vizualūs ir kvapo pokyčiai	Sugerties max., opt.t.vnt.	Vizualūs ir kvapo pokyčiai	Sugerties max., opt.t.vnt
1.	Kosmetikos valiklis				
2.	Etanolis				
3.	Vanduo				
4.	NaCl, 5 %				
5.	NaCl, 10 %				
6.	NaCl, 15 %				
7.	NaCl, 20 %				

Pastebėta, kad vandeninės terpės spektras po odos preparato inkubacijos pasižymėjo didesnėmis optinio tankio vertėmis visame 330–800 nm spektriniame intervale, lyginant su etanolio sugertimi. Tai gali būti dėl dviejų priežasčių:

- dėl spartesnio odos mėginio irimo į vandeninę terpę pateko daugiau endogeninių chromoforų. Čia galioja sugerties adityvumo principas (žr. 4 formulę), t. y. įvairių paminėtų endogeninių chromoforų sugerties spektrai persikloja, todėl suminis optinis tankis yra žymiai didesnis, lyginant su užregistruotu optiniu tankiu etanolio tirpale.

- kita priežastis – dėl didesnės biomolekulių koncentracijos tirpale padidėja sklaidos fonas, kai šviesą sklaido biomolekulės, kurių matmenys yra palyginami su šviesos bangos ilgiu. Todėl vandeninė mėginio terpė trumpabangėje spektrinėje srityje išsklaidys dalį šviesos, o spektre matysime optinio tankio padidėjimą, t. y. atitinka per mėginį praėjusios šviesos intensyvumo sumažėjimą (žr., 6 formulę) UV spektrinėje srityje.



10 pav. Tirpalų, gautų po odos mėginio inkubacijos etanolyje ir distiliuotame vandenyje, sugerties spektrai.

Užduotys:

1. Pagal pateiktą pavyzdį aprašykite išmatuotus spektrus.
2. Nustatykite, kurioje mėginio terpėje endogeninių porfirinų koncentracija buvo didžiausia.
3. Interpretuokite gautus spektrinius rezultatus.
4. Odą, kurioje užaugo bakterijos, inkubuokite dezinfekcinėse priemonėse ir pamatuokite, ar mažėja porfirinų koncentracija odos mėginio terpėje. Užpildykite darbo rezultatų lentelę.
5. Palyginamuoju būdu, iš endogeninių porfirinų optinio tankio pokyčio odos mėginio terpėse, nustatykite, kuri dezinfekcinė priemonė sunaikino daugiausia bakterijų.

Mokiniai padaro išvadas:

- Padarykite išvadą, kurie odos valikliai / kosmetinės priemonės yra tinkami apsaugai nuo bakterinio uždegimo.

- Ar greitai žūsta bakterijos, odą valant dezinfekcinėmis priemonėmis?

KONTROLINĖS UŽDUOTYS IR ATSAKYMAI:

Klausimai	Atsakymai
1. Kur randami porfirinai?	1. Porfirinai yra organinės molekulės, kurias savaime gamina gyvūnai ir kai kurios bakterijos. Būna geoporfirinų, kurie randami neapdirbtoje naftoje, anglyse ar nuosėdinėse uolienose. Kraujo hemą sudaro protoporfirino IX (PpIX) ir geležies (II) kompleksas. Sutrikus kraujo hemo sintezės savireguliaciniams mechanizms, audinių ląstelėse gali kauptis porfirininio tipo endogeniniai fluoroforai. Porfirinus taip pat galima sintetinti laboratorijoje ląsteles paveikiant pertekliniu aminolevulino rūgšties kiekiu.
2. Kokios yra spuogų atsiradimo priežastys?	2. Spuogų atsiranda dėl hormoninių pakitimų organizme, genetinio polinkio, psichologinių priežasčių bei dėl bakterijų veiklos. Spuogų kiekiui įtakos gali turėti ir dieta, „gerųjų“ bakterijų kiekis ir įvairovė.
3. Ar visų chromoforų, esančių žmogaus organizme, sugertį galima užregistruoti spektrometru?	3. Teoriškai, dauguma audinių chromoforų šviesą sugeria UV spektrinėje srityje. Praktiškai audinių chromoforų užregistruoti gali ir nepavykti, jei jų koncentracija maža arba jie yra giliai organizme, kadangi biologiniai audiniai stipriai išsklaido šviesą. Atliekant biologinių audinių tyrimus yra įprasta matuoti vandeninių, labai praskiestų biologinių audinių tirpalų bandinių chromoforų sugertį.
4. Šviesos sugerties dėsnis. Paaiškinkite Lamberto-Bugero-Bero dėsnį.	4.
5. Kiek kartų sumažėja per bandinį praėjusios monochromatinės šviesos intensyvumas, palyginti su krentančios šviesos intensyvumu, jei tirpalo optinis tankis $A = 1$; $A =$	5. Sumažėja atitinkamai 10, 100 ir 1000 kartų.

4.8. SPEKTROSKOPINIS CHLOROFILO NUSTATYMAS AUGALŲ EKSTRAKTUOSE

Bendrosios programos:

Vidurinis ugdymas. Išplėstinis kursas. 11–12 klasės.

9. Šiuolaikiniai tyrimo metodai	
Nuostata Kūrybingai ir saugiai tyrinėti gamtos reiškinius.	
Esminis gebėjimas Apibūdinti chemijoje taikomus tyrimo metodus.	
Gebėjimai	Žinios ir supratimas
9.1. Taikyti įgytas žinias apie medžiagos koncentraciją tirpale, siejant su koncentracijos reiškimo būdais.	9.1.2. Paaiškinti, kaip tirpalo spalvos intensyvumas susijęs su medžiagos koncentracija ir tirpalo sluoksnio storio.
9.2. Apibūdinti medžiagų sandaros tyrimo metodus.	9.2.5. Pateikti pavyzdžių, kaip fizikiniai medžiagų tyrimo metodai taikomi praktikoje.

Bendrosios programos:

Vidurinis ugdymas. Biologija. Bendrinis kursas. 11–12 klasės.

1. Metodologiniai biologijos klausimai	
Nuostata Įvairiais metodais tyrinėti biologinius reiškinius ir procesus.	
Esminis gebėjimas Analizuoti mokslinius metodus ir biologijos atradimų reikšmę.	
Gebėjimai	Žinios ir supratimas
1.3. Taikyti matematikos ir informacijos paieškos žinias ir gebėjimus tyrimų rezultatams apdoroti.	1.3.1. Tiksliai atlikti matavimus ir apibendrinti gautus rezultatus. Apskaičiuoti procentus, vidurkius, santykius. Užrašyti gautus rezultatus ir pavaizduoti juos naudojantis kompiuterinėmis technologijomis.
2. Ląstelė – gyvybės pagrindas	
Nuostata Suvokti ląstelę kaip mažiausią organizmo dalelę, kurioje vyksta gyvybiniai procesai.	
Esminis gebėjimas Suprasti, kad visi organizmai sudaryti iš ląstelių, paaiškinti ląstelėse vykstančių procesų reikšmę gyvybinei organizmo veiklai.	
Gebėjimai	Žinios ir supratimas
2.1. Apibūdinti organinius junginius, įeinančius į ląstelių sudėtį. 2.5. Apibūdinti energijos ir medžiagų virsmus ląstelėje ir organizme.	2.1.2. Atlikti įvairių augalinės kilmės maisto produktų tyrimus pasirinktai organinei medžiagai nustatyti. 2.5.4. Apibūdinti fotosintezę kaip augalų ląstelėse vykstantį procesą, kurio metu šviesos energija vartojama organinėms molekulėms sintetinti.

Bendrosios programos:

Vidurinis ugdymas. Biologija. Išplėstinis kursas. 11–12 klasės.

1. Metodologiniai biologijos klausimai**Nuostata**

Įvairiais metodais tyrinėti biologinius reiškinius ir procesus.

Esminis gebėjimas

Analizuoti mokslinius metodus ir biologijos atradimų reikšmę.

Gebėjimai	Žinios ir supratimas
1.3. Taikyti matematikos ir informacijos paieškos žinias ir gebėjimus tyrimų rezultatams apdoroti ir problemoms spręsti.	1.3.1. Tiksliai atlikti matavimus, apibendrinti ir pateikti gautus rezultatus. Apskaičiuoti procentus, vidurkius, santykius. Užrašyti gautus rezultatus, apdoroti juos statistškai ir pavaizduoti naudojantis kompiuterinėmis technologijomis.

2. Ląstelė – gyvybės pagrindas**Nuostata**

Suvokti ląstelę kaip mažiausią organizmo dalelę, kurioje vyksta gyvybiniai procesai.

Esminis gebėjimas

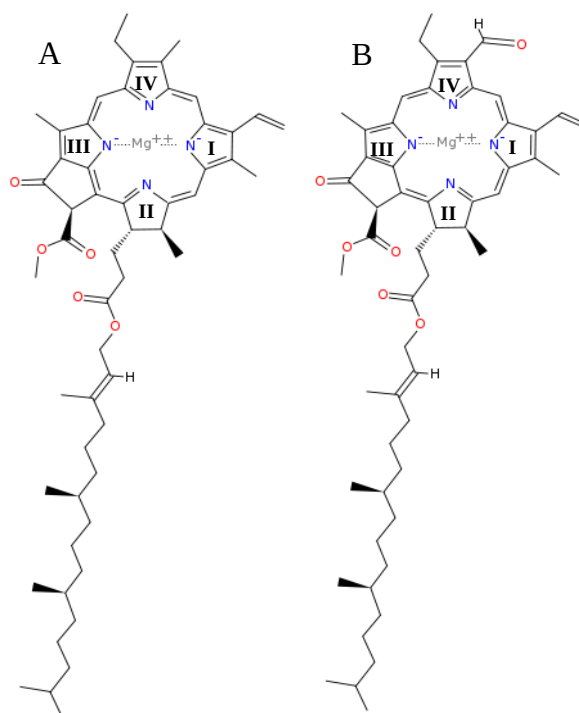
Suprasti, kad visi organizmai sudaryti iš ląstelių, paaiškinti ląstelėse vykstančių procesų reikšmę gyvybinei organizmo veiklai.

Gebėjimai	Žinios ir supratimas
2.1. Apibūdinti organinius junginius, įeinančius į ląstelių sudėtį. Paaiškinti šių organinių junginių ir vandens reikšmę organizmo gyvybinėms funkcijoms. 2.5. Paaiškinti energijos ir medžiagų virsmus ląstelėje ir organizme.	2.1.2. Atlikti įvairių augalinės kilmės maisto produktų tyrimus pasirinktai organinei medžiagai nustatyti. 2.5.7. Apibūdinti fotosintezę kaip augalų ląstelėse vykstančią procesą, kurio metu šviesos energija vartojama organinėms molekulėms sintetinti.

LABORATORINIO DARBO TEORINIS PAGRINDIMAS

Chlorofilas yra žalias pigmentas, randamas augalų ir dumblių chloroplastuose bei cianobakterijose. Fotosintezės metu chlorofilas sugeria saulės spindulių energiją ir paverčia ją chemine energija. Tokiu būdu iš anglies dioksido ir vandens gaminami angliavandeniliai, pvz., cukrus. Kaip šalutinis produktas, sukuriama deguonis. Augalų lapuose yra dviejų tipų chlorofilo: chlorofilas *a* $C_{55}H_{72}MgN_4O_5$ (žaliai melsvo atspalvio), kurio struktūrinė formulė parodyta 1 a paveiksle, ir chlorofilas *b* $C_{55}H_{70}MgN_4O_6$ (žaliai gelsvo atspalvio), kurio struktūrinė formulė parodyta 1 b paveiksle.

Nors chlorofilų struktūra yra labai sudėtinga, vis dėlto nesunku pastebėti, kad pagrindinis jų struktūrinis vienetas yra pirolas. Tarpusavyje sujungti keturi pirolų žiedai (I, II, III, IV) ir magnio atomas sudaro kiekvienos chlorofilo molekulės branduolį – porfirino



1 pav. Chlorofilo *a* (A) ir chlorofilo *b* (B) struktūrinės formulės.

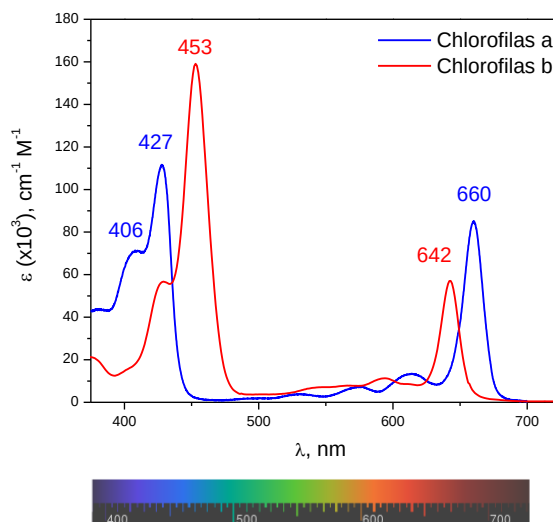
žiedą.

Pagrindinis biologiniu požiūriu yra chlorofilas *a*, kurio turi visi fotosintezę vykstantys organizmai, o pagalbinio chlorofilo *b* augaluose yra 3–5 kartus mažiau.

Chlorofilo molekulės geriausiai sugeria mėlyną ($\lambda = 400\text{--}470\text{ nm}$) bei raudoną ($\lambda = 620\text{--}700\text{ nm}$) šviesą (2 pav.). Žalios šviesos chlorofilas nesugeria, todėl augalai mums atrodo žali.

Iš sugerties spektrų galima kokybiškai nustatyti, kurio tipo chlorofilas vyrauja augale. Raudonuosius spindulius šiek tiek intensyviau sugeria chlorofilas *a*, mėlynuosius – chlorofilas *b*. Mėlynojoje spektro srityje chlorofilų sugerties spektrai persikloja su kitų augalinių pigmentų, pvz., karotenoidų, sugerties spektru, todėl chlorofilų *a* ir *b* atskyrimui patogiau naudoti raudonąją spektro sritį. Kaip matyti iš 2 paveiksle pateiktų spektrų, dietileteryje ištirpinto chlorofilo *a* sugerties maksimumas raudonojoje spektro srityje yra ties 660 nm, o chlorofilo *b* – ties 642 nm.

Chlorofilas vandenyje netirpsta, o veikiamas šarmais ar rūgštimis greitai suyra, todėl chlorofilo išskyrimui iš augalų geriausia naudoti organinius tirpiklius, pvz., acetoną, metanolį, etanolį, dietilerį, chloroformą (trichlormetaną). Priklausomai nuo naudojamo tirpiklio, keičiasi chlorofilo *a* ir *b* sugerties juostų maksimumų padėtys (λ_{max}) bei moliniai sugerties koeficientai, kai λ_{max} (1 lentelė).



2 pav. Chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* tirpalų dietileteryje sugerties spektrai. ϵ – molinis sugerties koeficientas, parodantis chlorofilo molekulės gebėjimą sugerti skirtingų bangos ilgių (λ) šviesą. Paveikslo apačioje patektas elektromagnetinių bangų spalvų spektras.

1 lentelė

Tirpiklio įtaka chlorofilo *a* ir *b* sugerčiai ilgabangėje spektrinėje srityje.

Tirpiklis	Chlorofilas <i>a</i> ,			Chlorofilas <i>b</i>		
	λ_{max1} nm	$\epsilon \times 10^{-3}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$		λ_{max2} nm	$\epsilon \times 10^{-3}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	
Metanolis	665	$\epsilon_{665} = 71,4$	$\epsilon_{652} = 31,7$	652	$\epsilon_{652} = 38,6$	$\epsilon_{665} = 20,2$
Dietileris	660	$\epsilon_{660} = 85,3$	$\epsilon_{642} = 14,8$	642	$\epsilon_{642} = 57,0$	$\epsilon_{660} = 5,1$
Acetonas	663	$\epsilon_{663} = 73,3$	$\epsilon_{645} = 15,0$	645	$\epsilon_{645} = 41,4$	$\epsilon_{663} = 8,4$

Chlorofilui augalų lapų ekstraktuose nustatyti naudojamas fizikinis metodas – sugerties spektroskopija. Šviesai sklindant nevysiškai skaidria medžiaga, mažėja jos intensyvumas ir keičiasi spektrinė sudėtis. Jei visų bangos ilgių šviesa sugerama vienodai, tai tokia sugertis vadinama *paprastąja*. Paprastoji sugertis nekeičia šviesos spektrinės sudėties, tačiau keičia jos intensyvumą, kuris, sklindant medžiaga, palaipsniui mažėja. Jei skirtingo bangos ilgio šviesa sugerama skirtingai, tada sugertis vadinama *atrankiąja*. Atrankioji sugertis keičia šviesos spektrinę sudėtį. Taip yra todėl, kad medžiagos atomai ir molekulės nevienodai sugeria skirtingo bangos ilgio šviesą. Dėl atrankiosios sugerties balta šviesa, praėjusi per medžiagos sluoksnį, tampa spalvota. Ištyrę per medžiagą praėjusios šviesos spektrinę sudėtį, galime nustatyti, kokie atomai ir molekulės sudaro medžiagą, kokie procesai vyksta medžiagoje. Toks tyrimo metodas vadinamas *optine spektroskopija*.

Pagrindinį šviesos sugertį aprašantį dėsnį 1729 m. eksperimentiškai nustatė prancūzų mokslininkas P. Bugaras, o teoriškai 1760 m. pagrindė vokiečių mokslininkas J. Lambertas. Pagal šį dėsnį šviesos intensyvumo sumažėjimas, perėjus jai per be galo ploną medžiagos sluoksnį, yra tiesiog proporcingas to sluoksnio storiui ir kritusios į šį sluoksnį šviesos intensyvumui. Kai medžiagos sluoksnio storis l nėra be galo plonas, tada pagal Bugero ir Lamberto dėsnį praėjusios per medžiagos sluoksnį šviesos intensyvumas yra:

$$I = I_0 e^{-K_\lambda l}; \quad (1)$$

čia I yra praėjusios per medžiagą šviesos intensyvumas, kai kritusios šviesos intensyvumas buvo I_0 , e yra natūrinio logaritmo pagrindas, λ – šviesos bangos ilgis. Proporcingumo koeficientas K_λ yra vadinamas *monochromatiniu sugerties koeficientu*. Jo matavimo vienetas m^{-1} arba cm^{-1} . K_λ priklauso nuo šviesos bangos ilgio, medžiagos sudėties ir sugeriančių šviesą atomų ir molekulių koncentracijos. Kadangi šis koeficientas priklauso nuo šviesos bangos ilgio, skirtingų bangos ilgių šviesa sugerama nevienodai. Grafiškai pateikiama ši priklausomybė vadinama sugerties spektru, kuris suteikia informaciją apie medžiagos sandarą ir būseną.

Mokslininkas A. Beras 1852 m. tyrinėdamas šviesos sugertį tirpaluose pastebėjo, kad silpnųjų elektrolitų tirpalų monochromatinės šviesos sugerties koeficientas yra tiesiog proporcingas tirpalo koncentracijai:

$$K_\lambda = k_\lambda \cdot c; \quad (2)$$

čia c yra tirpalo koncentracija, k_λ – *molekulinis sugerties koeficientas*. Sujungę formules (1) ir (2), gauname jungtinį Bugero, Lamberto ir Bero dėsnį:

$$I = I_0 e^{-K_\lambda \cdot c \cdot l}; \quad (3)$$

Sugerties koeficientas K_λ nustatomas iš formulės (1), išmatavus medžiagos sluoksnio storį l ir per medžiagą praėjusios ir kritusios šviesos intensyvumų santykį, vadinamą medžiagos sluoksnio *pralaidumo faktoriumi*:

$$T_\lambda = \frac{I}{I_0} = e^{-K_\lambda \cdot l}. \quad (4)$$

Dažniausiai pralaidumo faktorius išreiškiamas procentais. Atvirkščio dydžio pralaidumo faktoriui dešimtainis logaritmas yra vadinamas medžiagos sluoksnio *optiniu tankiu*:

$$A_\lambda = \lg \frac{1}{T_\lambda} = 0,4343 \cdot K_\lambda \cdot l. \quad (5)$$

Matyti, kad optinis tankis yra tiesiog proporcingas sugerties koeficientui.

5 lygtį yra nepatogu naudoti kokybiniais koncentracijos skaičiavimams, todėl, atlikę matematinius pertvarkymus ir koncentracijos matavimo vienetais pasirinkę mol/l (M), gausime lygtį optiniam tankiui A skaičiuoti:

$$\lg \frac{I}{I_0} = -\lg T = \varepsilon \cdot c \cdot l = A; \quad (6)$$

čia ε – molinis sugerties koeficientas [$l / (mol \cdot cm)$] arba [$M^{-1} cm^{-1}$].

Optinis tankis yra adityvus dydis: dviejų tirpalų mišinio optinis tankis lygus kiekvieno tirpalo optinių tankių sumai:

$$A_{1+2} = A_1 + A_2. \quad (7)$$

Kadangi chlorofilų sugerties spektrai skiriasi savo forma ir sugerties maksimumų padėtimis, naudojant (6) ir (7) formules galima kiekybiškai nustatyti chlorofilo a ir chlorofilo b koncentracijas

augalų lapų ekstraktuose. Įvertinę chlorofilų mišinio optinį tankį A ties dviem skirtingais bangų ilgiais λ_1 ir λ_2 , galime užrašyti lygčių sistemą:

$$A_{\lambda_1} = \varepsilon_{1,\lambda_1} \cdot c_1 \cdot l + \varepsilon_{2,\lambda_1} \cdot c_2 \cdot l, \quad (8)$$

$$A_{\lambda_2} = \varepsilon_{1,\lambda_2} \cdot c_1 \cdot l + \varepsilon_{2,\lambda_2} \cdot c_2 \cdot l.$$

Išsprendę lygčių sistemą (8), sudarome lygtis (9 ir 10) tirpalo sudėtyje esančių komponentų koncentracijų c_1 ir c_2 skaičiavimui.

$$c_1 = \frac{A_{\lambda_1} - \varepsilon_{2,\lambda_1} \cdot c_2 \cdot l}{\varepsilon_{1,\lambda_1} \cdot l} \quad (9)$$

$$c_2 = \frac{A_{\lambda_1} \cdot \frac{\varepsilon_{1,\lambda_2}}{\varepsilon_{1,\lambda_1}} - A_{\lambda_2}}{\frac{\varepsilon_{1,\lambda_2} \cdot \varepsilon_{2,\lambda_1}}{\varepsilon_{1,\lambda_1}} \cdot l - \varepsilon_{2,\lambda_2} \cdot l}. \quad (10)$$

Norėdami užtikrinti didesnę tikslumą λ_1 ir λ_2 turėtume parinkti tokius, kuriems esant chlorofilų a ir b mišinį sudarančių molekulių sugertis skirtųsi labiausiai.

Kitaip, paprasčiau chlorofilo koncentraciją c [$\mu\text{g/ml}$] galima apskaičiuoti naudojantis Lichtentaler ir Wellburn formulėmis, pateiktomis 2 lentelėje:

2 lentelė

Formulės, naudojamos chlorofilo a ir chlorofilo b koncentracijoms skaičiuoti.

Tirpiklis	Chlorofilas a	Chlorofilas b
Metanolis	$c_a = 15,65 A_{666} - 7,340 A_{653} \quad (11)$	$c_b = 27,05 A_{653} - 11,21 A_{666} \quad (12)$
Dietileteris	$c_a = 10,05 A_{662} - 0,766 A_{644} \quad (13)$	$c_b = 16,37 A_{644} - 3,140 A_{662} \quad (14)$
Acetonas	$c_a = 11,75 A_{662} - 2,350 A_{645} \quad (15)$	$c_b = 18,61 A_{645} - 3,960 A_{662} \quad (16)$

Prietaisas, skirtas šviesos spektrams registruoti, vadinamas *spektrometru*. Standartinio spektrometro, skirto pralaidumo spektrams tirti, optinė schema pavaizduota 3 paveiksle. Pagrindiniai tokio spektrometro komponentai yra šie: plataus spektro šviesos šaltinis, monochromatorius, kiuvetė su tiriamu tirpalu ir šviesos intensyvumo detektorius. Monochromatorius yra skirtas iš plataus šviesos šaltinio spektro išskirti reikiamo bangos ilgio šviesą, kuri per galinį plyšį nukreipiama į tiriamą bandinį. Pagrindinis monochromatoriaus elementas yra prizmė arba difrakcinė gardelė, kuri išskleidžia baltą šviesą į spektrą. Sukant prizmę (difrakcinę gardelę) galima į išėjimo plyšį nukreipti reikiamo bangos ilgio baltos šviesos spektro dalį. Krintančios į kiuvetę ir praėjusios per kiuvetę šviesos intensyvumas, kurio vertė rodoma prietaiso ekrane arba su prietaisu sujungtame kompiuteryje, registruojamas detektoriumi. 3 paveiksle parodytu spektrometru kiekvienu laiko momentu registruojamas tik vieno bangos ilgio šviesos intensyvumas. Norint užregistruoti visą praėjusios šviesos spektrą, reikia keisti iš monochromatoriaus išeinančios šviesos bangos ilgį ir atlikti matavimus iš eilės keletui bangos ilgių. Spektrometruose, kuriuose detektorius yra fotodiodų liniuotė, visas spektras registruojamas iš karto, kadangi į detektoriaus atskirus elementus patenka tiriamos šviesos spektro skirtingo bangos ilgio šviesa. Spektrometro su diodų liniuote optinė schema pavaizduota 4 paveiksle.

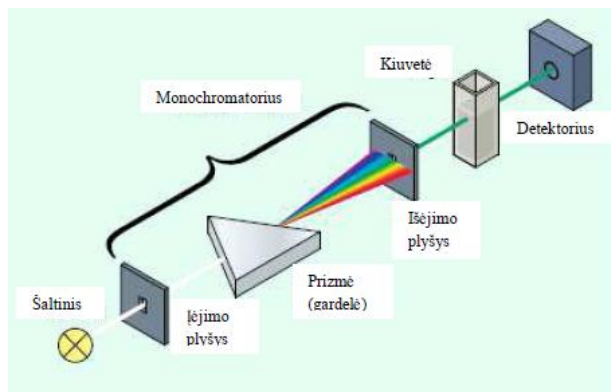
LABORATORINIO DARBO METODIKA

Laboratorinis darbas atliekamas **II lygmeniu**, kaip struktūruotas tyrinėjimas. Mokiniams pateikiama nuosekli darbo eiga bei tyrimui atlikti skirtų priemonių sąrašas. Remdamiesi iškeltu tikslu bei dirbdami pagal pateiktą darbo aprašą, mokiniai susipažįsta su spektroskopo veikimo principu ir jo naudojimu, geba paruošti augalinės žaliavos ekstraktą bei spektroskopu gali eksperimentiškai nustatyti chlorofilo kiekį augaluose, patikrina suformuluotą hipotezę.

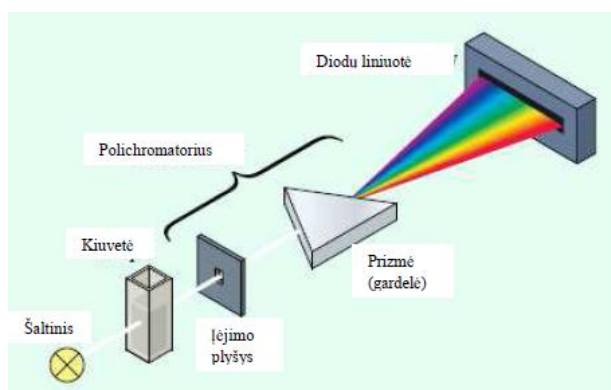
Eksperimentas atliekamas naudojant kompiuterinę mokymo sistemą Explorer GLX bei spektroskopą, kuriuo nustatoma chlorofilo koncentracija augaluose.

Kadangi eksperimento rezultatai mokiniams nėra iš anksto žinomi, atsiranda galimybė diskusijai grupėse. Rezultatų analizė ir aptarimas gali būti atliekami grupelėmis po 3–5 mokinius. Siūloma kiekvienai grupei tirti skirtingus augalus, o darbo rezultatus aptarti ir apibendrinti bei suformuluoti išvadas kartu.

Šį laboratorinį darbą galima atlikti kaip IV lygmens tyrinėjimą. Jį galima siūlyti kaip baigiamąjį tiriamąjį darbą arba kaip projektinį darbą suformuluojant tyrimo problemą.



3 pav. Standartinio spektrometro optinė schema.



4 pav. Spektrometro su diodų liniuote optinė schema

EKSPERIMENTAS

Tyrimo problema. Naudojant sugerties spektroskopijos metodiką atlikti augalų ekstraktų kiekybinę ir kokybinę spektrometrinę analizę.

Eksperimento tikslas – nustatyti chlorofilo (a ir b) koncentraciją augalų ekstraktuose.

Tyrimo hipotezės:

- Chlorofilo koncentracija skirtinguose augalų ekstraktuose yra nevienoda.
- Chlorofilo koncentracija tos pačios rūšies augalo ekstraktuose, kai augalas žalias ir kai sudžiūvęs / pageltęs / nuvytęs, yra nevienoda.
- Kuo lapas žalesnis, tuo jame daugiau chlorofilo.
- Chlorofilo koncentracija tos pačios rūšies augalo ekstraktuose priklauso nuo augalo auginimo sąlygų (apšvietimo, laistymo, tręšimo, oro temperatūros ir kt.).

Laukiami rezultatai:

- Žinos spektrometro veikimo principą.
- Supras sugerties spektroskopijos metodiką.
- Išmoks spektrometrinį chlorofilo koncentracijos nustatymo augalų ekstraktuose metodą;
- Gebės pasiruošti augalų ekstraktus.
- Sužinos, kurie augalai turi daugiausia chlorofilo.
- Žinos chlorofilo naudą gamtoje.

Eksperimento medžiagos ir priemonės:

- Xplorer GLX;
- UV-VIS spektrofotometras „Ocean Optics Red Tide USB 650“;
- 1 cm optinio kelio ilgio kiuvetės (jei dirbama su acetoliniais augalų ekstraktais naudojamos stiklinės kiuvetės, jei su etanoliniais – plastikinės);
- Žali augalai;
- Smulkintuvas arba peilis;
- Analizinės svarstyklės
- 70% etanolio tirpalas;
- Grūstuvė;
- 25 ml stiklinės ar kiti indai tirpalui laikyti (jei dirbama su acetoliniais augalų ekstraktais naudojami stikliniai indai, jei su etanoliniais – plastikiniai);
- Matavimo cilindras;
- Piltuvėliai;
- Filtravimo popierius;
- Maistinė plėvelė arba *parafilmas*.

Darbo eiga:

1. *Chlorofilo mėginių paruošimas.*

- 1.1. Įsigyti žalių augalų / surinkti žalius augalus, kuriuos tirsime. Tai gali būti medžių lapai ar spygliai, kambarinių gėlių lapai, džiovinti lapai, arbatžolės ir pan.
- 1.2. Augalų masę susmulkinti smulkintuvu ar smulkiai supjaustyti peiliu.
- 1.3. Pasverti 2 g smulkintos augalų masės (5 pav.).



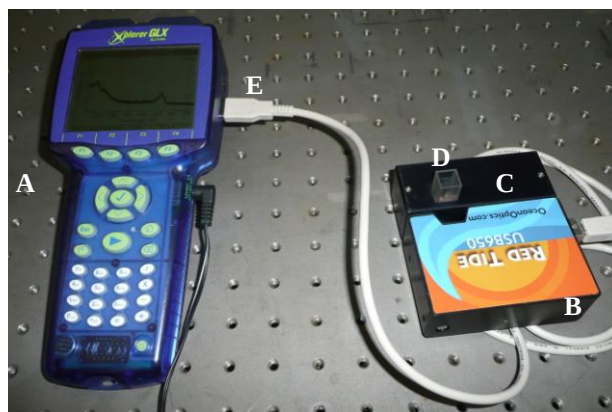
5 pav. Susmulkinti džiovinti augalai.



6 pav. Tirpalo filtravimas.

- 1.4. Mėginį perkelti į grūstuvę ir dar kartą sutrinti, kol pasidarys vienalytė žalia masė. Kad lengviau susitrintų, galima naudoti švarų smėlį (5–10 % mėginio tūrio).
- 1.5. Mėginį supilti į 25 ml stiklinę, kurioje bandinį ekstrahuosime 70 % etanoliu. Galima naudoti ir kitus tirpiklius. Naudojant acetoną, reikia imti stiklinį indą, nes acetonas tirpdo kai kuriuos plastikus.

- 1.6. Matavimo cilindru pamatuoti 20 ml etanolio ir jį pilti į stiklinę ant susmulkintos augalinės žaliavos.
- 1.7. Supurtyti ir palaikyti vieną parą (kartais papurtant), kad etanolis ekstrahuotų (ištrauktų) chlorofilą iš augalinės žaliavos.
- 1.8. Po paros atliekamas filtravimas, t. y. augalinė žaliava atskiriama nuo tirpalo. Filtravimui paruošiama kita stiklinė, į kurią įstatomas piltuvėlis su filtriniu popieriumi (6 pav.), sudrėkintu ekstrahavimui naudotu tirpikliu. Į paruoštą filtravimui stiklinę su piltuvėliu pilamas tirpalas su augaline žaliava. Norint darbą pagreitinti, stiklinę su ekstrahuojama augaline žaliava galima laikyti 3 val. inde su vandeniu, kurio temperatūra yra 40 °C.
- 1.9. Gautą skaidrų tirpalą praskiesti 5 kartus etanolio: į kitą indą įpilti 1 ml tirpalo ir 4 ml acetono. Skiesti reikia tiek, kad spektrometru pamatuoto optinio tankio A vertės būtų tarp 0,1 ir 1,2. Kuo žalesnė tirpalo spalva, tuo daugiau reikia skiesti. Tirpalą skiedžiant 10 kartų, pilama 1 ml tirpalo ir 9 ml tirpiklio (etanolio): 10 ml / 1ml = 10 kartų. Skiedžiant 20 kartų, sumaišomas 1 ml tirpalo ir 19 ml tirpiklio: 20 ml / 1 ml = 20 kartų. Skiedžiant 7 kartus, maišoma 1 ml tirpalo ir 6 ml tirpiklio: 7 ml / 1 ml = 7 kartai. Taupant reagentus, tirpalo ir tirpiklio tūrį galima sumažinti 2 kartus, skiedimas išlieka toks pat, pvz., skiedžiant 20 kartų, maišoma 0,5 ml tirpalo ir 9,5 ml tirpiklio: 10 ml / 0,5 ml = 20 kartų.

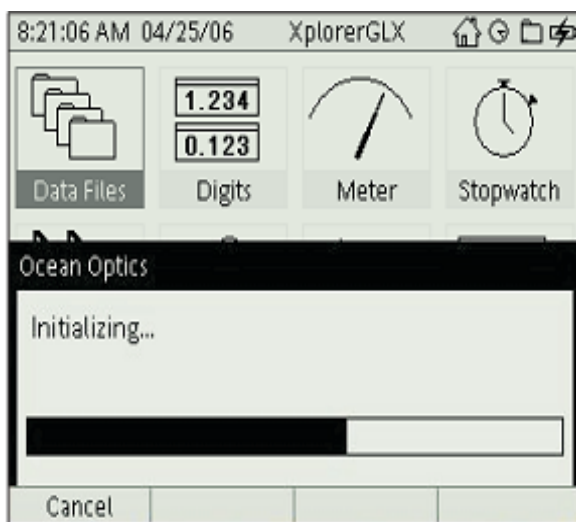


7 pav. Sugerties spektro matavimo aparatūros schema. A) Xplorer GLX; B) spektrometras Ocean Optics Red Tide USB 650; C) integruotas šviesos šaltinis; D) plastikinė kiuvetė; E) USB laidas spektrometro prijungimui prie GLX.

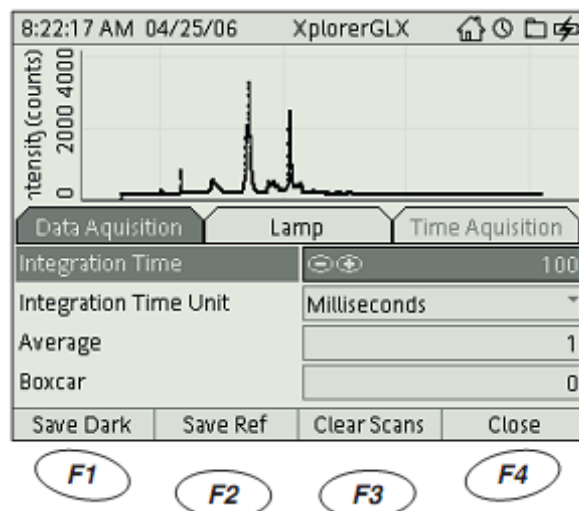
2. Aparatūros sujungimas ir testavimas

2.1. Sujunkite aparatūrą, kaip

pavaizduota 7 paveiksle: įjunkite GLX paspausdami mygtuką prietaiso dešinėje, apačioje. USB laidu prijunkite spektrometrą prie GLX. Prijunkite maitinimo bloką, kai GLX programa aptinka Ocean Optics spektrometrą.



8 pav. Spektrometro instaliavimo langas.



9 pav. Spektrometro Analysis Configuration režimas.

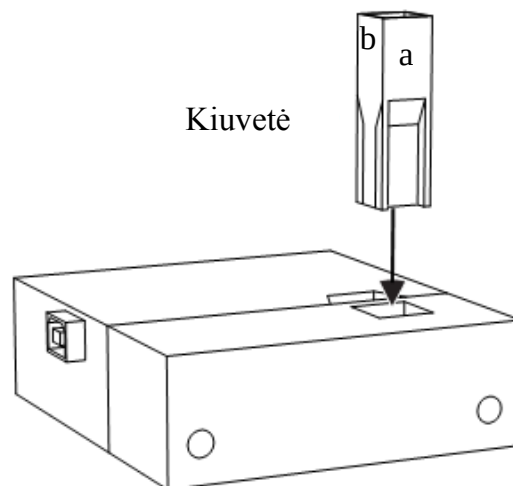
- 2.2. GLX reikalauja specialios licenzijos darbui su Ocean Optics spektrometru. Pirmą kartą įdiegus licenziją, jos įdiegti kiekvieną kartą dirbant su spektrometru nereikia.

Licenzija, įrašyta USB atmintinėje, pateikiama kartu su spektrometru. Licenzijos įdiegimas: USB atmintinę, kurioje įrašytas licenzijos failas, prijunkite prie GLX; ekrane pasirodys užrašas „There is 1 license available for 'Ocean Optics Spectrometer'.

Would you like to add a license to this GLX?“. Sutikdami spauskite **F1**. Ekrane atsiras žinutė: „Successfully added license for Ocean Optics Spectrometer“. Dar kartą paspauskite **F1**.

Prijungus spektrometrą, įsižiebia šviesos šaltinis ir atsiranda instaliavimo langas (*Ocean Optics Initializing...*) (8 pav.). GLX spektrometrą atpažįsta automatiškai. Po kelių sekundžių spektrometras paruoštas darbui.

- 2.3. GLX ekrane atsiranda spektrometro *Analysis Configuration* režimas (9 pav.).
- 2.4. Paspauskite varnelę (✓) kai pažymėta *Integration time* ir nustatykite 15 ms. Paspaudus varnelę dar kartą, reikšmė užfiksuojama.
- 2.5. Paspauskite varnelę kai pažymėta *Average*, ir nustatykite 5.
- 2.6. Rodykle į dešinę (→) nueikite į lempą (*Lamp*).
- 2.7. Varnele nustatykite, kad pirmose dviejose eilutėse parodytos lempos būtų įjungtos (*ON*).
- 2.8. Į spektroskopo angą įdėkite juodą kiuvetę ir paspauskite mygtuką **F1** (*Save dark*) (Pav. 9).
- 2.9. Įpilkite į matavimo kiuvetę 1 ml tirpiklio (70 % etanolio). Reikia pilti tokio tirpiklio, kuriuo buvo užpilta augalinė žaliava.
- 2.10. Išimkite juodą kiuvetę ir įdėkite kiuvetę su etanolium. Kiuvetę reikia dėti taip, kad skaidri sienelė būtų atkreipta į lempą (Pav. 10). Šiuo atveju šviesos kelio ilgis l yra lygus 1 cm. Jei kiuvetę įdėtumėte plokštuma a atgręžta į lempą, l bus lygus 0.5 cm. Atitinkamai gautą optinio tankio vertę reikės padauginti iš 2.
- 2.11. Paspauskite **F2** (*Save ref*) (Pav. 9).
- 2.12. Paspauskite **F4** (*Close*) ir uždarysite langą.
- 2.13. Paspaudus **F4**, atsiranda *Time acquisition* langas.
- 2.14. Mygtukais **F1** ir **F2** sukalibravote spektroskopą. Jei matavimų metu signalo nėra ar iškilo kita problema, spauskite **F3** (*Clear Scan*) kad viską išvalytumėte. Kalibruokite iš naujo.
- 2.15. Darbo metu norėdami dar kartą patekti į spektrometro *Analysis Configuration* režimą: Spauskite **GL** + **F1**, atsiras „Grafinio atvaizdavimo“ langas. Spauskite **F3** atidaryti Įrankiai (*Tools*) meniu. Naudodami rodyklinius klavišus eikite žemyn ir pasirinkite *Spectrum Analysis Config* ir spauskite varnelę (✓).



10 pav. Kiuvetės padėtis spektrometre.

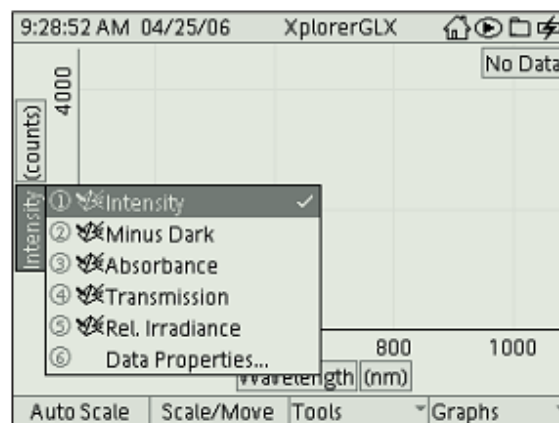
3. Mėginių spektro matavimas

- 3.1. Paspaudus **F4**, automatiškai atsiranda *Graph screen* atvaizdavimo langas. Tai pagrindinis jūsų darbo langas, kuriame galėsite matuoti tirpalų sugerties ir pralaidumo spektrus.
- 3.2. Du kartus paspauskite varnelę (✓) ir rodyklių pagalba nustatykite, kad y ašyje rodytų absorbciją (*Absorbance*) (Pav. 11).

- 3.3. Spauskite , ir bus matuojamas spektras.
- 3.4. Dar kartą spauskite , kad sustabdytumėte matavimą.
- 3.5. Norėdami išdidinti dominančią spektro dalį (400–700 nm), spauskite *F2* (*Scale/Move*).

Rodyklėmis  spektrą išdidinkite.

- 3.6. Norėdami reikiamą spektro dalį pastumti į ekrano vidurį, antrą kartą spauskite *F2* ir rodyklėmis spektrą pastumkite, kur reikia.
- 3.7. Paspauskite *F3* (*Tools*) ir išsirinkę *Smart tools*, paspauskite varnelę



11 pav. Matavimų režimo grafinis langas.

-  Atsirąs rutuliukas, rodantis *x* ir *y* vertes. Rodyklėmis  nueikite ant dominančio spektro smailės (tarkime, 660 nm), ir ekrane matysite optinio tankio vertę (šiuo atveju chlorofilo A absorbcija).
- 3.8. Rodyklėmis nueikite ant kitos smailės (tarkime, 550 nm) ir taip pat matysite absorbcijos vertę (šiuo atveju chlorofilo B absorbcija).
- 3.9. Vertes surašykite į lentelę (3 lentelė).
- 3.10. Išmatuota sugertis *A* (matuojama optinio tankio vienetais) turi neviršyti 1.2. Jei yra daugiau, mėginį reikia skiesti. Tarkime, gavome kad *A* yra 3. Mėginį reikės skiesti 3 kartus: paimti 1 dalį turimo mėginio ir į jį įpilti 2 dalis tirpiklio (etanolio).

3 lentelė

Matavimų duomenys							
Augalai	Skiedimas [kartais]	Sugerties spektro maksimumai, [nm]		A (660–665 nm), [opt.t.vn t.]	A (642–652 nm), [opt.t.vn t.]	Chlorofilo koncentracija, µg/ml	
		400–500 nm srityje	600–700 nm srityje			<i>a</i>	<i>b</i>
Klevas	100	406; 429; 452	660	0,146	0,148	3,58	1,43
Beržas	100	408	662	0,071	0,056	1,55	0,48
Eglė	100	406; 429; 452	660	0,162	0,023	0,69	0,18
Liepa	100	406; 429; 452	659	0,343	0,106	2,53	1,03
Dracena	100	406; 429; 452	660	0,252	0,075	1,72	0,75
Pipirmėtė	100	429; 452	668				
Ugniažolė	100	406; 429; 452	660	0,133	0,011	0,22	0,13
Melisa	100	429; 452	667				

Duomenys
kokybinei
mišinio
analizei.

Duomenys
kiekybinei
mišinio
analizei.

- 3.11. Pagal 2 lentelėje pateiktas formules raskite chlorofilo *a* ir *b* koncentracijas. Jei naudojote etanolį, naudokite formules su metanolio:

Tirpiklis	Chlorofilas <i>a</i>	Chlorofilas <i>b</i>
Metanolis	$c_a = 15,65 A_{666} - 7,340 A_{653} \quad (11)$	$c_b = 27,05 A_{653} - 11,21 A_{666} \quad (12)$

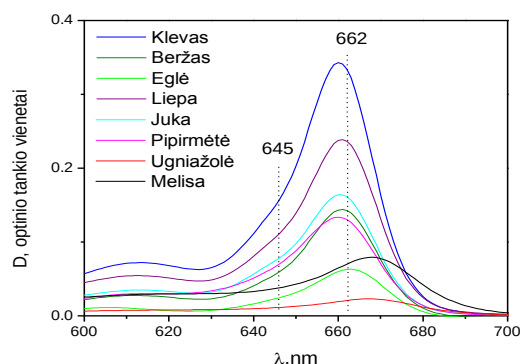
3.12. Gautas chlorofilo koncentracijos vertes dauginkite iš skiedimų skaičiaus. Gavote chlorofilo A ir B koncentracijas.

4. *Rezultatų analizė*

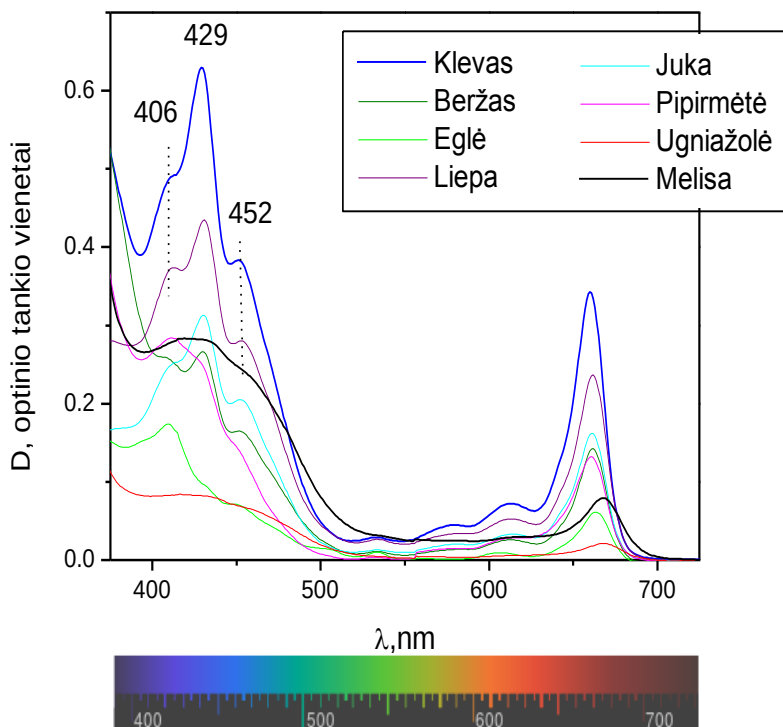
Augalų ekstraktų spektrai pasižymėjo plačiomis sugerties juostomis mėlynojoje ir raudonojoje spektrinėje srityje. Visų ištirtų augalų ekstraktų spektruose galima išskirti sugerties juostas būdingas chlorofilui *a* ir chlorofilui *b*. Chlorofilas *a* ir chlorofilas *b* intensyviausiai sugėrė šviesos spindulius mėlynojoje spektrinėje srityje, sugerties maksimumai lokalizuoti ties 429 nm ir 452 nm (12 pav.).

Mėlynojoje ir UV (200–500 nm) spektrinėje srityje esanti chlorofilų sugertis persikloja su kitų augaluose esančių pigmentų, pvz., karotinoidų, taip pat baltymų, kai kurių vitaminų sugertimi. Tai apsunkina spektrinių duomenų interpretavimą, todėl toliau darbe tirsime augalų ekstraktų sugertį tik raudonojoje spektrinėje srityje (13 pav.). Priklausomai nuo panaudoto tirpiklio, chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* koncentracijoms nustatyti reikia pritaikyti 11–16 formules.

Iš sugerties spektrų nustatėme, kad daugumos tirtų mėginių sugerties spektro maksimumas yra ties 660±2 nm. Tai reiškia, kad minėtuose augaluose yra žymiai daugiau chlorofilo *a* nei chlorofilo *b*, kurio sugerties maksimumas yra ties 642 nm.



12 pav. Augalų ekstraktų sugerties spektrai.



13 pav. Chlorofilo *a* ir *b* koncentracijos nustatymas iš augalų ekstraktų sugerties spektrų.

Iš sugerties spektrų įvertinome augalų ekstraktų optinio tankio vertes ties 662 ir 645 nm. Kadangi pipirmėtės ir melisos sugerties maksimumas buvo ties 667–668 nm, todėl šių duomenų kiekybinei chlorofilų mišinio analizei nenaudojome. Priklausomai nuo panaudoto tirpiklio,

chlorofilo koncentracijos skaičiavimams galima naudoti 1 lentelėje pateiktas $\lambda_{\max 1}$, ir $\lambda_{\max 2}$ vertes bei jas atitinkančius ε duomenis.

Nustatėme, kad daugiausiai chlorofilo *a* ir *b* buvo klevo mėginyje.

Mokiniai padaro išvadas:

- kurie tirti augalai turi daugiausia chlorofilo, o kurie mažiausia;
- kaip priklauso chlorofilo kiekis nuo augalo augimo sąlygų?

KONTROLINĖS UŽDUOTYS IR ATSAKYMAI:

Klausimai	Atsakymai
1. Kodėl lapas žalias?	1. Augalų lapuose esantis chlorofilas geriausiai sugeria mėlyną bei raudoną šviesą. Žalią šviesą chlorofilas atspindi, atspindėta šviesa patenka į mūsų akis, todėl augalai mums atrodo žali.
2. Kodėl rudenį lapai keičia spalvą?	2. Rudenį, kai pažemėja aplinkos temperatūra, sulėtėja chlorofilo sintezė, o vėliau jis visai nesintetinamas ir lapuose išnyksta. Tada pamatome kitus pigmentus – karotenoidus, kurie lapams suteikia geltoną – oranžinę spalvas. Karotenoidai lape buvo visą laiką, tačiau chlorofilui būdinga žalia spalva juos užgožė, ir jų nesimatė. Tuo tarpu raudoną – purpurinę spalvą lemia kiti pigmentai – antocianinai, kurie pradedami sintetinti tik atėjus rudeniiui.
3. Kodėl morka yra geltona, o braškė – raudona?	3. Morkose, moliūguose ir kituose oranžinės spalvos augaluose vyrauja pigmentas karotenoidas, kuris suteikia būdingą oranžinę spalvą, braškėse, pomidoruose pagrindinis pigmentas yra raudoną spalvą lemiantis antocianinas.
4. Nuo ko priklauso chlorofilo kiekis augale?	4. Chlorofilo kiekis augale priklauso tiek nuo augalo rūšies, tiek nuo aplinkos sąlygų. Tos pačios rūšies augalas, kai jo augimo aplinkos sąlygos (temperatūra, vandens, trąšų ar šviesos kiekis) skiriasi, turės skirtingą kiekį chlorofilo arba skirtingą chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> kiekių santykį.
5. Kas galėjo lemti chlorofilo koncentracijos nustatymą eksperimento metu?	5. Eksperimento metu chlorofilo kiekį labiausiai galėjo įtakoti chlorofilo ekstrakcija. Jei augalas buvo nepilnai susmulkintas arba per trumpai palaikytas acetone, ne visas chlorofilas pateko į tirpalą. Jei pamatuotas optinis tankis yra daugiau nei 1,2, tai taip pat duos didesnes paklaidas.
6. Ar gyvūnams augalai taip pat žali?	6. Ne. Žalia spalva yra ne augalų savybė, o mūsų smegenų savybė suvokti elektromagnetines bangas. Todėl vieni gyvūnai pasaulį mato nespaltvotą, kiti dar mato raudoną spalvą ir panašiai.
7. Ar gyvūnai gali turėti chlorofilo?	7. Taip. Nors dažniausiai gyvūnai chlorofilo neturi, tačiau yra išimčių. Kai kurie jūriniai šliužai, besimaitinantys dumbliais, sudaro simbiozę su dumblių plastidėmis. Kai šliužai praryja dumblius, visą dumblių turinį suvirškina, išskyrus chloroplastus, kurie turi chlorofilo, ir laikinai gamina deguonį. Šis reiškinys vadinamas kleptoplastija (angl. <i>kleptoplasty</i>) ir simbiozė gali trukti nuo kelių dienų iki kelių

	mėnesių. Pavyzdžiui, kai šliužas <i>Elysia chlorotica</i> praryja dumblių <i>Vaucheria litorea</i> , simbiozė trunka iki 10 mėnesių, ir jos metu gaminamas deguonis.
--	--