



BIOLOGIJA

# **RAZISKOVANJE NEZNANIH SNOVI**

POROČILO LABORATORIJSKE VAJE

## 1) UVOD

Vsaka znanstvena raziskava poteka na podlagi znanstvene metode. To je način delovanja s katerim poizkušamo dokazati pravilnost neke domneve oziroma hipoteze, ki je nepreverjen sklep eksperimentatorja. Med znanstvene metode spadajo opazovanje, meritve in poskusi. Sami izberemo ustrezno znanstveno metodo raziskovanja s katero dobimo rezultate ter jih analiziramo. Pri poskusu je pomembno, da je lahko ponovljiv in da izvedemo tako kontrolni kot eksperimentalni poskus. Z opazovanjem sprememb pri poskusu dobimo podatke, ki so kvalitativni. Slednje zberemo izključno z opazovanjem (s čutili), medtem ko kvantitativne podatke navadno dobimo z merjenjem količin. Pri našem je bilo pomembno tudi to, da smo z živimi organizmi ravnali čim bolj etično. Z dobljenimi rezultati dobimo podatke, ki hipotezo ovržejo ali jo potrdijo. V primeru da jo potrdimo večkrat in to z različnimi metodami, ta prerase v zakon in nato v teorijo, ki je popolnoma dokazljiva s poskusi. Splošno priznana teorijo imenujemo nauk.

### ❖ Teoretične osnove

- ⇒ Indikatorji so snovi, ki reagirajo z določeno snovjo tako, da spremenijo barvo. Mednje spadata tudi fenol rdeče in apnena voda.
- ⇒ Če ogljikov dioksid raztopimo v vodi, nastane kislina.
- ⇒ Barvilo fenol rdeče je indikator roza barve, ki se ob prisotnosti kisline obarva rumeno.
- ⇒ Apnena voda (apnenica) pa ob stiku z ogljikovim dioksidom postane motna, zaradi nastanka apnenca. V epruveti je vidna oborina. To se zgodi po formuli:  
$$\text{Ca(OH)}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}_2\text{O}.$$
- ⇒  $\text{CO}_2$  se raztaplja v vodi (sodavica) in deloma z njo tudi reagira. Pri tem nastane šibka ogljikova kislina, ki spremeni indikatorju fenol rdečemu barvo. Vendar to še ni zadosten dokaz za prisotnost  $\text{CO}_2$ , ker barvo indikatorja spremenijo tudi druge kisline. Dodaten dokaz za  $\text{CO}_2$  je nastanek netopnega apnenca v nasičeni raztopini apnene vode.

### ❖ Namen in cilji laboratorijske vaje:

- ⇒ Spoznati se z znanstvenimi metodami dela, jih znati uporabljati pri reševanju problemov,
- ⇒ spoznati pomen kvalitativnih podatkov,
- ⇒ spoznati pomen kontroliranega poskusa,
- ⇒ znati z natančnim opazovanjem zbirati podatke,
- ⇒ spoznati in razumeti razlike med dejstvi, podatki in hipotezo,
- ⇒ spoznati etične probleme pri bioloških poskusih,
- ⇒ spoznati pojem indikatorja ter znati indikatorje praktično uporabljati,
- ⇒ spoznati še druge indikatorje za  $\text{CO}_2$ , ki bi bili primerni za določanje  $\text{CO}_2$  pri organizmih.
- ⇒ dokazati, da živi organizmi zaradi poteka življenjskih procesov izločajo  $\text{CO}_2$  v svojo okolico.

### ❖ - Hipoteza 1: V epruvetah, v katerih so živi organizmi (epruvete 2, 5, 6), življenjski procesi potekajo aktivno in nastaja $\text{CO}_2$ . Zaradi njegovega sproščanja se bo indikator fenol rdeče obarval rumeno.

-Hipoteza 2: Za vajo bi bili uporabni tudi drugi indikatorji poleg fenol rdečega.

## 2) MATERIAL IN METODE DELA

### ❖ Material:

- fenol rdeče barvilo,
- apnena voda,
- sodavica (karbonatna voda),
- razredčena kislina (HCl, CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>3</sub>CO<sub>3</sub> itd.),
- 4 kapalke,
- slamice,
- papirnate brisače,
- 3 stojala za epruvete,
- 7 malih epruvet z zamaški,
- 7 medeninastih vijakov, ki gredo v epruvete,
- 12 epruvet standardne velikosti,
- raztopina kvasa in sladkorja,
- prekuhana raztopina kvasa in sladkorja,
- 5 - 10 suhih semen (vrtna kreša)
- 5 - 10 kalečih semen iste vrste,
- 1 majhna živa žuželka (kobilica),
- 1 majhna mrtva žuželka iste vrste,
- Ura
- Radenska
- Brom timol modra
- Fenolin talein
- Kongo rdeče
- Lakmus indikator
- Metilensko modrilo

### ❖ Metode dela:

- poskus, opazovanje, beleženje opazovanj.

## 3) POSTOPEK

❖ Prvi del vaje:

V stojalo smo namestili 7 manjših epruвет (1-7) in vanje kanili 5 kapljic indikatorja fenol rdeče. Na dno rahlo nagnjenih posameznih epruвет smo namestili medeninaste vijake, s konico naprej, ki so služili kot podstavek za naslednji material:

- Epruветa 1: nič,
- Epruветa 2: zvit košček filtrirnega papirja pomočenega v raztopino kvasa in sladkorja,
- Epruветa 3: zvit košček filtrirnega papirja pomočenega v prekuhano raztopino kvasa in sladkorja,
- Epruветa 4: 5-10 suhih semen kreše,
- Epruветa 5: 5-10 kalečih semen kreše,
- Epruветa 6: živa kobilica,
- Epruветa 7: mrtva kobilica.

Ko smo vse pripravili, smo epruветe zamašili in opazovali spremembe fenol rdečega ter zabeležili čas spremembe.

❖ Drugi del vaje:

Drugih 6 epruвет (8-13) smo namestili v stojalo in v prve 3 kanili 10-12 kapljic indikatorja fenol rdečega, ostale tri pa smo do četrtnine napolnili z apneno vodo. Nato smo dodajali:

- Epruветa 8: 5 kapljic razredčene kisline HCl
- Epruветa 9: 10 kapljic sodavice
- Epruветa 10: izdihan zrak skozi slamico, 30s
- Epruветa 11: 15-20 kapljic razredčene kisline HCl
- Epruветa 12: 10 kapljic sodavice
- Epruветa 13: izdihan zrak skozi slamico, 30s

Opazovali smo spremembe in beležili njihov čas.

❖ Tretji del vaje: Ugotavljanje primernih indikatorjev.

Pripravili smo novih 6 epruвет:

- Epruветa 1: 5 ml fenol rdeče
- Epruветa 2: 5 ml brom timol modre
- Epruветa 3: 5 ml apnene vode
- Epruветa 4: 5 ml vode + 5 kapljic fenolftaleina
- Epruветa 5: 5 ml vode + 5 kapljic kongo rdečega barvila
- Epruветa 6: 5 ml vode + 5 kapljic metilenskega modrila
- Epruветa 7: Lakmus indikator (kontrolna epruветa)

Postopoma smo v vsako epruветo po kapljicah dodajali radensko, opazovali indikator in zapisali spremembo.

## 4) REZULTATI

**Tabela 1: Prikaz sprememb indikatorja fenol rdečega v prvem delu poskusa**

Št. epruvete	Delovni material	Sprememba indikatorja	Čas spremembe
1	5 kapljic fenol rdečega, medeninast vijak	/	/
2	5 kapljic fenol rdečega, medeninast vijak, košček filtrirnega papirja namočenega v svežo raztopino kvasovk in sladkorja	Obarva se svetlo rumeno	po 23 min
3	5 kapljic fenol rdečega, medeninast vijak, košček filtrirnega papirja namočenega v prekuhano raztopino kvasovk in sladkorja	/	/
4	5 kapljic fenol rdečega, medeninast vijak, 15 suhih semen	/	/
5	5 kapljic fenol rdečega, medeninast vijak, 15 kalečih semen	Obarva se svetlo rumeno	po 25 min
6	5 kapljic fenol rdečega, medeninast vijak, živa žuželka	Obarva se svetlo rumeno	po 21 min
7	5 kapljic fenol rdečega, medeninast vijak, mrtva žuželka	/	/

**Tabela 2: Prikaz sprememb indikatorjev fenol rdečega in apnene vode v drugem delu poskusa**

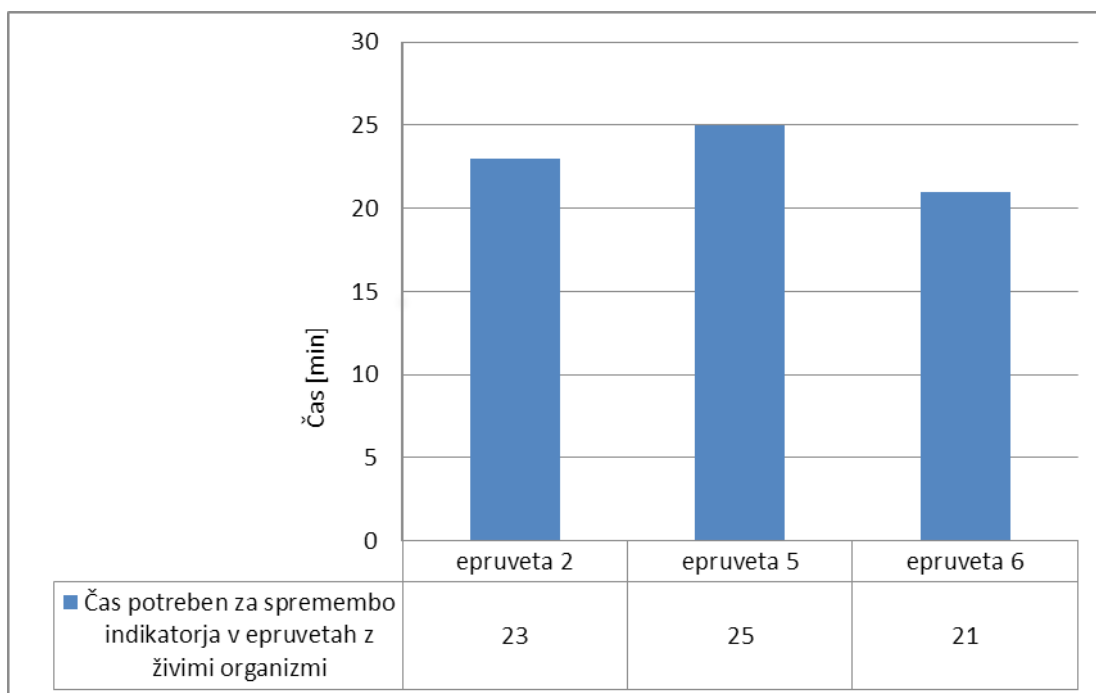
Št. epruvete	Delovni material	Sprememba indikatorja	Čas spremembe
8	10-12 kapljic FR, 5 kapljic razredčene HCl	obarva se rumeno	takoj
9	10-12 kapljic FR, 10 kapljic sodavice (mineralne vode)	obarva se rumeno	takoj
10	10-12 kapljic FR, 30 sekund pihamo skozi slamico v raztopimo FR	obarva se rumeno	takoj
11	2 cm apnene vode, 15 – 20 kapljic razredčene HCl	/	/
12	2 cm apnene vode, 10 kapljic sodavice	pomotni, nastane bela oborina	takoj
13	2 cm apnene vode, pihamo 30 sekund v apneno vodo	pomotni, nastane bela oborina	takoj

**Tabela 3:  
Prikaz**

sprememb indikatorjev ob dodajanju kapljic radenske

Št.	Delovni material	Sprememba	Št. kapljic
-----	------------------	-----------	-------------

epruvete		indikatorja	radenske potrebnih za spremembo
1	5 ml fenol rdeče	Bledo roza	2
2	5 ml brom timol modre	Zelena	3
3	5 ml apnene vode	Tekočina z belo oborino	1
4	5 ml vode + 5 kapljic fenolftaleina	ni spremembe	Več kot 20
5	5 ml vode + 5 kapljic kongo rdečega	ni spremembe	Več kot 20
6	5 ml vode + 5 kapljic metilenskega modrila	ni spremembe	Več kot 20
7	Lakmus indikator (kontrolna epruveta)	ni spremembe	Več kot 20



Graf 1: Prikaz časa, potrebnega za spremembo indikatorja v epruvtah z živimi organizmi (epruveta 2, 5 in 6)

## 5) DISKUSIJA

❖ Rezultati iz prvega dela so pokazali sledeče:

Epruveta 1: V epruveti 1 z medeninastim vijakom ni prišlo do spremembe. Kontrolna epruveta oziroma epruveta 1 pokaže, da zaradi vijaka in snovi v zraku ne pride do spremembe indikatorja. Vijake smo torej uporabili zato, da dodana snov oz. organizem v preostalih šestih epruvetah ni prišel v stik z indikatorjem.

Epruveta 2: V epruvetah s svežimi kvasovkami in sladkorjem je prišlo do spremembe indikatorja. Sklepam, da so bile kvasovke aktivne.

Epruveta 3: V epruveti 3 s prekuhano raztopino kvasovk ni prišlo do spremembe. Sklepam, da so v njej očitno mrtvi organizmi, ki ne vršijo metabolnih procesov..

Epruveta 4: V epruveti 4 z nekalečimi semeni ni prišlo do spremembe indikatorja. Napačno bi sklepali, če bi rekli, da niso živa. Če bi epruveto 4 pustili dalj časa zaprto, bi prišlo do spremembe indikatorja, saj so nekaleča semena sicer živa, a toliko manj aktivna. Za izločanje zadostne količine CO<sub>2</sub> in posledično spremembo indikatorja bi bilo sicer potrebnega več časa.

Epruveta 5: V epruveti 5 s kalečimi semeni je prišlo do spremembe indikatorja. Celično dihanje vršijo po formuli:  $C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 12H_2O + \text{energija}$

Epruveta 6: V epruveti 6 z živo kobilico je prišlo do spremembe indikatorja. Sklepam, da je vršila celično dihanje.

Epruveta 7: V epruveti 7 z mrtvo kobilico ni prišlo do spremembe. Ne vrši procesov celičnega dihanja, ni zaznati spremembe v indikatorju saj ni prisotnega CO<sub>2</sub>.

Ugotovimo, da pri epruvetah z živimi organizmi pride do spremembe barve indikatorja fenol rdečega zaradi izdihanega CO<sub>2</sub>.

Sicer pa če se barva fenol rdečega spremeni v rumeno, lahko sklepamo le, da je v njem prisotna kislina, ni pa nujno, da je v njej tudi ogljikov dioksid. Dvom o tem za kaj točno je fenol rdeč indikator smo rešili v drugem delu poskusa, ko smo delali poskus še z apneno vodo.

S primerjavo časa, potrebnega za spremembo smo ugotovili, da je bila sprememba indikatorja fenol rdečega najhitrejša v epruveti 6 z živo žuželko, kar nakazuje na to, da je ta najaktivnejša, najhitreje izloča CO<sub>2</sub>. Potekla je v 21 minuti. Malo počasnejša je bila sprememba v epruveti 2 s koščkom filtrirnega papirja namočenega v svežo raztopino kvasovk in sladkorja. Potekla je v 23 minuti. Tudi kvasovke aktivno izločajo CO<sub>2</sub>, sicer počasneje kot kobilica. Najpočasnejša sprememba se je po 25 minuti zgodila v epruveti 5 v kateri je bilo 15 kalečih semen. Tudi pri teh se je v okolju nabralo dovolj CO<sub>2</sub> za spremembo, čeprav je res, da so ga semena lahko sproti rabile za potek fotosinteze, zato se je počasneje nabiral. Sprememba pa bi po dalj času lahko potekla tudi v epruveti 4 v kateri je bilo 15 suhih semen, saj so ta aktivna, a premalo da bi se v kratkem času nabralo dovolj CO<sub>2</sub> da bi potekla sprememba indikatorja. Velja tudi, da večje kot je število semen, hitrejša je sprememba.

❖ Na podlagi drugega dela poskusa smo torej ugotavljali s katero snovjo reagira indikator fenol rdeče.

V epruvete 8, 9,10, smo vnesli indikator fenol rdeč, v epruvete 11, 12, 13 pa apneno vodo. V epruvete 9, 10, 12, 13 smo nato vnesli CO<sub>2</sub>, kislino pa v epruveti 8 in 11.

Epruveta 8: V epruveti 8 s fenol rdečim in razredčeno kislino HCl se je barva indikatorja iz rožnate spremenila v rumeno. Sklep: Indikator fenol rdeč spremeni barvo v rumeno, kadar pride v stik s kislino.

Epruveta 9: V epruveti 9 s fenol rdečim in sodavico se je barva indikatorja spremenila v rumeno. Sklep: Tudi v tej epruveti je nastala kislina, ki je spremenila barvo. Sodavica sicer vsebuje ogljikov dioksid, ki ob stiku z vodo reagira v šibko ogljikovo kislino, ki je obstojna le v vodnih raztopinah. Formula za to reakcijo je  $H_2O + CO_2 \rightarrow H_2CO_3$ .

Epruveta 10: V epruveti 10 s fenol rdečim se je po 30 sekundah pihanja vanj skozi slamico barva indikatorja spremenila v rumeno. Sklep: Ob izdihanem ogljikovem dioksidu se je tvorila ogljikova kislina, zato se je fenol rdeč spet obarval rumeno.

Epruveta 11: V epruveti 11 z apneno vodo in razredčeno kislino se sprememba ni zgodila. Sklep: Apnica ni indikator za kisline.

Epruveta 12: V epruveti 12 z apneno vodo in sodavico je prišlo do spremembe, tvorila se je motna tekočina z belo oborino. Sklep: Apnenica je indikator za ogljikov dioksid, ker ga sodavica namreč vsebuje. Ob stiku z njim postane motna zaradi novonastalega apnenca. To potrjuje tudi formula:  $Ca(OH)_2 + CO_2 \rightarrow CaCO_3 + H_2O$ .

Epruveta 13: V epruveti 13 z apneno vodo je po 30 sekundah pihanja vanjo skozi slamico prišlo do spremembe. Apnica je postala motna, nastala je bela oborina. Sklep: Pri prejšnji epruveti smo ugotovili, da je apnena voda indikator za ogljikov dioksid, zdaj lahko iz tega sklepamo, da je v izdihanem zraku ogljikov dioksid tisti, ki povzroči spremembo apnene vode.

Do spremembe apnene vode je prišlo v epruvetah 12 in 13 kjer je bil prisoten  $CO_2$ , v epruveti 11 z apneno vodo in kislino pa do sprememb ni prišlo. Rezultati so torej pokazali, da apnena voda reagira le v stiku s  $CO_2$ . Vidna je oborina, reakcija pa povzroči tudi motnost snovi. Tako sklepamo, da je apnena voda zagotov pokazatelj prisotnosti plina  $CO_2$ . Ker ob prisotnosti kisline do spremembe ni prišlo sklepamo, da apnena voda ni indikator za kisline. Fenol rdeč pa ni zagotov pokazatelj  $CO_2$ , saj se je obarval tako ob prisotnosti  $CO_2$  v epruvetah 9 in 10 kot tudi ob prisotnosti kisline v epruveti 8. Sklepamo torej, da je fenol rdeče splošni indikator kislina.

S poznavanjem delovanja indikatorja fenol rdečega ter procesov, ki se izvršujejo v živih organizmih, lahko sklepamo, da je prav ogljikov dioksid tista snov, ki je v prvem delu vaje povzročil spremembo barve indikatorja fenol rdečega, čeprav smo v drugem delu ugotovili, da ta ni njegov zagotov pokazatelj.

#### MOŽNE NAPAKE:

Odstopanja od pričakovanih rezultatov bi lahko poskusili hipotetično razložiti. Če bi prišlo do spremembe fenol rdečega indikatorja v epruveti 1, ki je služila kot kontrolna in zato v njej ne sme priti do spremembe, potem bi bili rezultati celotne vaje neveljavni. Pozitiven rezultat v sedmi epruveti, pa bi lahko pojasnili s prisotnostjo saprofitskih mikroorganizmov na odmrli žuželki. Prisotnost le-teh lahko preverimo z odvzemom brisa z živali, ali novim poskusom, ki bi vključeval mrtvo žuželko, ki smo jo zaščitil pred gnitjem (npr. z alkoholom) in tako, ki je nismo.

❖ V tretjem delu smo prišli do naslednjih ugotovitev:



Epruveta 1: V epruveti 1 je bilo 5 ml fenol rdeče. Barva je pobledela v blede roza po dveh kapljicah radenske, ki vsebuje CO<sub>2</sub>.

Epruveta 2: V epruveti 2 je bilo 5 ml brom timol modre. Sprememba se je zgodila po 3. kapljici in sicer iz modre v zeleno barvo.

Epruveta 3: V epruveti 3 je bilo 5 ml apnene vode. Sprememba se je zgodila že po prvi kapljici radenske. Iz čiste prozorne barve je snov spremenila barvo v motno, z belo oborino.

Sklepamo da apnena voda najhitreje reagira ob prisotnosti CO<sub>2</sub> in je tako najboljčutljivejši indikator.

Epruveta 4: V epruveti 4 je bilo 5 ml vode in 5 kapljic fenolftaleina. Ni bilo zaznati spremembe po dodajanju kapljic radenske.

Epruveta 5: V epruveti 5 je bilo 5 ml vode in 5 kapljic kongo rdečega barvila. Ni bilo zaznati spremembe.

Epruveta 6: V epruveti 6 je bilo 5 ml vode in 5 kapljic metilenskega modrila. Ni bilo zaznati spremembe.

Epruveta 7: Lakmus indikator (kontrolna epruveta). Zmešali smo ga z vodo, ki ima vrednost 7.0 pH, obarva se zeleno. Po prvi kapljici radenske se je pH znižal na 7.5, po dveh 7.0, po treh 7.0 in po nadaljnjem dodajanju (več kot 20 kapljic) je ostal pH še vedno 7.0.

V tretjem delu smo poskusili ugotoviti ustreznost drugih indikatorjev za ta poskus.

Iz rezultatov je razvidno da bi lahko za ugotavljanje CO<sub>2</sub>, ki ga izločajo organizmi poleg fenol rdečega lahko uporabili tudi apneno vodo ali pa brom timol moder indikator. Kljub temu pa bi bilo možno, da apnena voda ne bi bila tako dober pokazatelj prisotnosti CO<sub>2</sub>, saj je težko ocenjevati njeno spremembo, ker ob reakciji ni tako očitno vidnega barvnega preskoka kot pri drugih dveh indikatorjih.

Poskus bi lahko označili za etično spornega saj smo eno kobilico ubili. Uporabili smo tudi žive organizme, sicer pa smo z njimi ravnali kar se da pazljivo ter jih pozneje izpustitli.

Poskus prvega dela bi bilo potrebno ponoviti z vsemi tremi indikatorji.

## 6) SKLEPI

- ⇒ Hipoteza 1 je bila potrjena. Dokazali smo, da vsa živa bitja izločajo CO<sub>2</sub>, ki povzroči spremembo barve indikatorja fenol rdeče v rumeno.
- ⇒ Tudi hipoteza 2 je bila potrjena. Poskus bi lahko opravili tudi z drugimi indikatorji poleg fenol rdečega, kot na primer z apneno vodo ali brom timol modrim indikatorjem.
- ⇒ Živa bitja izločajo pri procesu celičnega dihanja CO<sub>2</sub>, ki tvori z vodo šibko ogljikovo kislino.
- ⇒ Fenol rdeče je splošen indikator kislin. Ob stiku s kislino spremeni barvo iz rdeče, preko oranžne v rumeno.
- ⇒ Apnena voda pa je indikator le za CO<sub>2</sub>. Ob prisotnosti CO<sub>2</sub> pomotni, nastane tudi oborina, ne reagira pa z ostalimi kislinami.
- ⇒ Bolj kot je organizem aktiven, več CO<sub>2</sub> izloči.
- ⇒ Suha semena so živi, a manj aktivni organizmi.
- ⇒ Podatki o spremembi barve so bili dobljeni z opazovanjem, zato so kvalitativni, se nanašajo na kakovost opazovane snovi.
- ⇒ Za vajo z organizmi bi bila primerna indikatorja tudi apnena voda ali pa brom timol moder indikator poleg fenol rdečega.
- ⇒ Za vajo neprimerni indikatorji so metilensko modrilo, kongo rdeče barvilo, fenolftalein.
- ⇒ Pojavijo se lahko etični problemi, ker smo pri vaji uporabili žive organizme.

## 7) VIRI IN LITERATURA

- Jože Drašler, BIOLOGIJA, Navodila za laboratorijsko delo, DZS, Ljubljana, 2008.