

Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave
Fakulta prírodných vied
Katedra biotechnológií



LABORATÓRNE CVIČENIA

Z BIOLÓGIE I

Michaela Havrlentová, Daniela Chmelová, Michaela Piliarová

Trnava 2020

Autorský kolektív:

RNDr. Michaela Havrlentová, PhD. (UCM, AH)

RNDr. Daniela Chmelová, PhD. (UCM, AH)

Mgr. Michaela Piliarová, PhD. (UCM, AH)

Recenzenti:

doc. RNDr. Miroslav Ondrejovič, PhD.

doc. Ing. Jozef Fejér, PhD.

Schválené Edičnou radou Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave a vedením Fakulty prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave ako učebný text pre študentov vysokých škôl.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani jeho časť nemožno reprodukovat' bez súhlasu majiteľa práv.

© Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

© RNDr. Michaela Havrlentová, PhD.

© RNDr. Daniela Chmelová, PhD.

© Mgr. Michaela Piliarová, PhD.

Vydavateľ: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, 2020

Vydanie: prvé

ISBN 978-80-8105-943-8

PREDSLOV

Skriptum „Laboratórne cvičenia z biológie I“ sumarizuje základné princípy a metódy využívané v biologickom výskume. Poskytuje teoretický základ vysvetľujúci princípy vybraných laboratórnych techník a úlohy, ktoré by mali preveriť pochopenie danej študijnej oblasti. Predložený študijný materiál je primárne určený študentom odboru Biotechnológie, ako aj všetkým tým, ktorí majú záujem naučiť sa základné postupy bežne využívané v biologickom výskume.

Zámerom tohto učebného textu je prehĺbiť u študentov vedomosti o samotných experimentálnych metódach, ako aj umožniť získanie experimentálnych skúsenosti z tejto oblasti.

Autori

OBSAH

LABORATÓRNY PORIADOK.....	5
BEZPEČNOSŤ PRÁCE V LABORATÓRIU	7
PRVÁ POMOC PRI NEHODE	9
NEBEZPEČNÉ LÁTKY V BIOLOGICKOM LABORATÓRIU	10
LABORATÓRNY DENNÍK.....	12
PRACOVNÉ PROTOKOLY	12
VYBAVENIE BIOLOGICKÉHO LABORATÓRIA.....	14
DELENIE POMÔCOK VZHĽADOM NA ICH ÚČEL.....	16
ČISTENIE SKLA	22
ZDROJE TEPLA V BIOLOGICKOM LABORATÓRIU	23
VÁKUUM A JEHO ZDROJE	26
VODA V LABORATÓRIU	28
CHEMIKÁLIE A ICH UCHOVÁVANIE.....	29
ZÁKLADNÉ OPERÁCIE V BIOLOGICKOM LABORATÓRIU	30
ZÁKLADY MIKROSKOPOVANIA.....	36
SACHARIDY.....	45
PROTEÍNY	60
LIPIDY	67
NUKLEOVÉ KYSELINY	75
RASTLINNÉ FARBIVÁ.....	82
BIOGÉNNE PRVKY	90
BUNKA A PROSTREDIE	93
RASTLINNÉ PLETIVÁ.....	99
ŽIVOČÍŠNE TKANIVÁ	107
POUŽITÁ LITERATÚRA.....	112
PRÍLOHA – Vzor protokolu Laboratórnych cvičení z biológie I.....	114

LABORATÓRNY PORIADOK

1. Študent je povinný sa zoznámiť pred začatím práce v laboratóriu s laboratórnym poriadkom, s bezpečnostnými predpismi a s pravidlami poskytnutia prvej pomoci pri ohrození zdravia.
2. Študent je povinný oboznámiť sa pred začatím práce v laboratóriu so zásadami priebehu laboratórných cvičení, so študijným materiálom, so spôsobom, ako sa na cvičenia pripraviť a ako hodnotí laboratórne cvičenia vyučujúci.
3. Účasť na laboratórných cvičeniach je pre študenta povinná a každá absencia musí byť ospravedlnená. Ak má študent vážne osobné/zdravotné dôvody, pre ktoré sa nemôže zúčastniť cvičenia, oznámi ich vyučujúcemu, ak je to možné vopred. Každé zameškané cvičenie musí byť nahradené. Na termíne náhradného cvičenia sa dohodne študent s vyučujúcim.
4. Študent je povinný prichádzať do laboratória včas a riadne pripravený. Musí mať pripravené potrebné výpočty na prípravu roztokov, poznať látky, s ktorými bude pracovať a ich vlastnosti. Pred začatím cvičenia vyučujúci overí znalosť študentov formou krátkeho písomného testu a ústneho preskúšania. Pokiaľ vyučujúci usúdi na základe previerky znalostí, že študent nemá dostatočné znalosti na riešenie daného cvičenia, cvičenie vykoná študent v náhradnom termíne.
5. Pri práci v laboratóriu musí mať študent zapnutý pracovný plášť, vhodnú obuv a pracovné pomôcky (poznámkový zošit s napísanou prípravou, ceruzku, pero, fixku na sklo, pravítko, nožnice). Dlhšie vlasy má študent vypnuté a taktiež nemá žiadne visiace náušnice, náramky na rukách a doplnky, ktoré by bránili bezpečnej práci v laboratóriu.
6. Študenti pracujú v dvojiciach, prípadne v trojici.
7. Pred samotnou prácou si študenti prezrú laboratórne prístroje a pomôcky. Pripravujú si na pracovný stôl všetky potrebné laboratórne pomôcky. Pred používaním prístrojov sa musí študent najskôr zoznámiť s ich obsluhou. Študent je taktiež oboznámený s vlastnosťami každej chemikálie, s ktorou pracuje (či ide o prchavú látku, toxickú, jed a podobne). S rizikovými látkami pracuje študent bezpečne, v rukaviciach a v zapnutom digestore.
8. Všetky nedostatky a poruchy zistené pred začatím práce alebo počas nej, okamžite hlási študent vyučujúcemu.
9. Pri práci na cvičení je nutné postupovať presne podľa zadanej úlohy a pokynov vyučujúceho.
10. So všetkými laboratórnymi pomôckami pracuje študent opatrne a bezpečne. Chráni seba i ostatných v laboratóriu pred rizikom otvoreného ohňa, nebezpečnej chemickej látky alebo rozbitia skla.
11. Študent si popisuje zodpovedne všetko laboratórne sklo, v ktorom skladuje chemické roztoky.
12. Priebeh práce a dosiahnuté výsledky si každý študent zaznamenáva do laboratórneho denníka. Po skončení každej úlohy ukáže povinne študent dosiahnuté výsledky

vyučujúcemu, v inom prípade nie je považované laboratórne cvičenie za úspešne zrealizované.

13. Počas nasledujúceho cvičenia odovzdáva každý študent vypracovaný laboratórny protokol, ktorý musí obsahovať všetky nevyhnutné náležitosti, musí byť podpísaný a napísaný na predpísanom formuláre.
14. Po skončení práce je študent povinný upratať svoje pracovné miesto, vypnúť elektrické spotrebiče, poriadne umyť sklo (saponátom a hubkou), opláchnuť ho dôkladne v destilovanej vode a vložiť správne do sušiarne.
15. Študent môže opustiť laboratórium až po kontrole dosiahnutých výsledkov a stavu pracovného stola vyučujúcim.
16. Prípadné nehody študenta v laboratóriu alebo akékoľvek (aj drobné) poranenie, prípadne nevoľnosť je nutné ihneď hlásiť vyučujúcemu a v prípade potreby zahájiť okamžite prvú pomoc.

Kontrolné otázky

1. Aké sú povinnosti študenta pred vstupom do laboratória?
2. Aké nevyhnutné pomôcky potrebuje študent pri vstupe do laboratória?
3. Ako má byť študent upravený pre prácu v laboratóriu?
4. Akým spôsobom robí vyučujúci preskúšanie študenta na začiatku laboratórneho cvičenia?
5. S čím sa má študent oboznámiť pre začatím samotnej práce v laboratóriu?
6. Čo musí študent nevyhnutne vykonať po ukončení práce?
7. Za akých podmienok je laboratórne cvičenie správne zrealizované?
8. Na čo študentovi slúži poznámkový blok?
9. Čo všetko musí študent hlásiť počas laboratórneho cvičenia vyučujúcemu?
10. Akým spôsobom je potrebné umyť laboratórne sklo po skončení práce v laboratóriu?

BEZPEČNOSŤ PRÁCE V LABORATÓRIU

1. Práce sa uskutočňujú výhradne podľa pokynov vyučujúceho a pracovného návodu.
2. Tašky a oblečenie študentov je potrebné uložiť do skriň mimo laboratória.
3. V laboratóriu sa nikdy neje, nepije a nefajčí.
4. Na jedenie a pitie (aj mimo laboratória) sa nikdy nepoužíva chemické sklo.
5. Chemikálie sa nikdy neochutnávajú a neinhaliujú sa ich výpary.
6. Práca s jedovatými, prchavými a páchnucimi látkami sa uskutočňuje iba v digestore so spustenou ventiláciou pod dozorom vyučujúceho.
7. Pipetuje sa výhradne pomocou balónikov alebo iných zdrojov podtlaku, nikdy nie ústami!
8. Pri práci pri podtlaku alebo pretlaku v sklenených aparátúrach sa používa iba nepoškodené (nie prasknuté) laboratórne sklo. Podtlakové časti aparatúry sa musia zakryť ochranným štítom.
9. Opravy alebo úpravy elektrickej inštalácie a prístrojov uskutočňuje iba osoba na to určená. V prípade nefunkčnosti zariadenia alebo jeho poruchy je potrebné toto hlásiť ihneď vyučujúcemu.
10. Pri práci so žieravinami a inými nebezpečnými látkami je potrebné pracovať veľmi opatrne, chrániť si tvár a oči ochranným štítom a ruky ochrannými rukavicami.
11. Na pracovisku sa udržiava vždy poriadok a čistota. Je nutné dbať na to, aby sa vonkajšie steny nádob alebo pracovné miesto nepostriekali chemikáliami.
12. Všetko laboratórne sklo, ktoré sa používa na prácu s chemikáliami a roztokmi, si musí študent vždy označiť viditeľne fixkou (najlepšie v hornej tretine laboratórneho skla).
13. Koncentrované kyseliny a zásady sa riedia tak, že kyselina alebo zásada sa leje tenkým prúdom po tyčinke do vody za súčasného miešania a chladenia, nie naopak.
14. Pri uskutočňovaní pokusov v skúmavkách sa drží ústie skúmavky odvrátené od tváre (svojej i spolupracovníkov).
15. Pri práci s horľavinami nesmie byť v blízkosti otvorený oheň. Pri destilácii horľavín je potrebné z okolia odstrániť zásobné nádoby horľavín a kontrolovať prietok vody v chladiči. Horľaviny nikdy nezahrievajte priamym plameňom, používajte kúpele (vodný alebo olejový) alebo ohrevné hniezda.
16. Zvýšenú pozornosť je potrebné venovať hlavne manipulácii s horľavinami I. triedy, ktoré majú teplotu vzplanutia do 21 °C (acetón, éter, metanol, etanol, benzín, benzén a toluén).
17. Črepiny a iné odpadky s ostrými hranami musia byť odkladané do nádob zvlášť k tomu určených, nikdy ich nehádzte do smetného koša.
18. Zvyšky jedov a organických rozpúšťadiel sa likvidujú podľa pokynov vyučujúceho. Zvyčajne sa zlievajú do zásobných fliaš na to určených a nikdy nie do umývadlovej výlevky.
19. Pri práci s éterom sa dbá na bezpečnostné opatrenia (možnosť vznietenia i od horúcich súčastí iných prístrojov).

20. So spotrebným materiálom, chemikáliami, energiou a prístrojmi musí študent zaobchádzať opatrne a šetrne.
21. V prípade rozbitia ortuťového teplomeru ohlásite túto skutočnosť ihneď vyučujúcemu a veľmi opatrne a všetky zvyšky teplomera sa zlikvidujú podľa pokynov vyučujúceho. Ortuť sa skladuje v uzatvorenej nádobe s vodou a zneškodňuje sa ako jed.
22. Ak vypukne požiar, je každý povinný pokúsiť sa ho uhasiť vlastnými silami bez ohrozenia vlastného života a života spolupracovníkov (hasiacim prístrojom, improvizovanými hasiacimi prostriedkami) a zároveň študent hlási túto skutočnosť ihneď vyučujúcemu. Je nutné ďalej vypnúť elektrický prúd a pokúsiť sa odstrániť z okolia požiaru horľavé látky (hlavne kvapaliny) a nádoby so stlačenými plynmi. Ak sa nedá požiar uhasiť vlastnými silami, je potrebné okamžite zavolať pomoc (tel. číslo 150 alebo 112).
23. V prípade nehody okamžite informujte vyučujúceho a zranenému sa poskytnie prvá pomoc. Vedúcemu cvičenia je treba hlásiť i každé nepatrné poranenie, bolesti hlavy, hučanie v ušiach, nevoľnosť a pod. Vo všetkých prípadoch je nutné spísať protokol o poranení, pre prípad neskorších komplikácií.
24. Po skončení práce v laboratóriu zanecháva študent čistý a uprataný pracovný stôl. Všetky použité chemikálie a roztoky sú buď uskladnené po ukončení práce v zásobných fľašiach alebo správne zneškodnené.
25. Po ukončení práce v laboratóriu je nutné si umyť ruky.

Kontrolné otázky

1. Čo je zakázané robiť v laboratóriu?
2. Kde sa v laboratóriu pracuje s jedovatými, prchavými a páchnucimi látkami?
3. Ako sa pipetujú roztoky?
4. V piatich boboch popíšte ako bezpečne pracovať v chemickom laboratóriu.
5. Ako sa riedia koncentrované kyseliny a zásady?
6. Aké zásady platia v laboratóriu pri práci s horľavinami?
7. Ako sa v laboratóriu odstraňujú zvyšky organických rozpúšťadiel?
8. Ako sa treba zachovať v prípade rozbitia ortuťového teplomeru?
9. Aké pravidlá platia v biologickom laboratóriu pri požari?
10. V akom stave zanecháva študent svoje pracovné miesto po ukončení práce v biologickom laboratóriu?

PRVÁ POMOC PRI NEHODE

Pri poleptaní kože silnou zásadou alebo kyselinou sa zasiahnuté miesto ihneď dôkladne opláchne prúdom vody. Pri poleptaní kyselinou sa neutralizuje miesto roztokom hydrogénuhličitanu sodného (NaHCO_3 ; 20 g.l^{-1}), pri poleptaní zásadou zriedenou kyselinou octovou (CH_3COOH ; 5 g.l^{-1}).

Pri zasiahnutí oka chemikáliami sa ihneď oko vypláchne slabým prúdom vody. V prípade zasiahnutia oka zásadou, oko sa vypláchne bórovou vodou (roztok kyseliny boritej, H_3BO_3 ; 30 g.l^{-1}). Ak sa jedná o kyselinu, použije na výplach roztok boraxu ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; tetraboritan sodný v koncentrácii 20 g.l^{-1}). V každom prípade je nutné vyhľadať očného lekára.

Pri poleptaní sliznice v ústach sa uskutoční dôkladný výplach úst vodou a následne neutralizácia výplachom zriedenou kyselinou octovou (poleptanie zásadou) alebo hydrogénuhličitanom sodným (poleptanie kyselinou).

Po požití zásady (NaOH ; KOH a pod.) sa odporúča piť zriedenú kyselinu octovú ($0,5 - 2,0 \text{ g.l}^{-1}$), po požití kyseliny sa pije suspenzia oxidu horečnatého alebo hydroxidu hlinitého vo vode. Po požití jedov je charakter prvej pomoci špecifický, podľa druhu otravy, odporúča sa vypíť aspoň $0,5 \text{ l}$ vody a vyvolať zvracanie. Je vždy nutné vyhľadať odborné lekárske ošetrovanie a informovať zároveň vyučujúceho.

Horiaci odev sa hasí prikrývkou alebo vodou. Pri likvidácii väčších plameňov sa použije hasiaci prístroj. Pri malých popáleninách je nutné ošetriť postihnuté miesto masťou na popáleniny a zakryť sterilným obvazom. Väčšie popáleniny ošetrí lekár.

Pri porezaní sklom je potrebné odstrániť z povrchovej rany sklo, okolie dezinfikovať zriedeným roztokom peroxidu vodíka (H_2O_2 ; 3 %; v/v) a obviazať sterilným obvazom. Väčšie zranenia ošetrí lekár.

Kontrolné otázky

1. Ako postupovať pri podávaní prvej pomoci pri poleptaní kože silnou kyselinou?
2. Ako postupovať pri podávaní prvej pomoci pri poleptaní kože silnou zásadou?
3. Ako postupovať pri podávaní prvej pomoci pri zasiahnutí oka zásadou alebo kyselinou?
4. Ako postupovať pri podávaní prvej pomoci pri požití zásady alebo kyseliny?
5. Ako postupovať pri podávaní prvej pomoci pri požití jedov?
6. Kedy sa odporúča piť suspenzia oxidu horečnatého vo vode?
7. Ako sa hasí v biologickom laboratóriu horiaci odev?
8. Ako sa ošetrujú v biologickom laboratóriu popáleniny?
9. Ako sa treba zachovať v biologickom laboratóriu pri porezaní sklom?
10. Je potrebné informovať vyučujúceho o akomkoľvek poranení vzniknutom pri práci v biologickom laboratóriu?

NEBEZPEČNÉ LÁTKY V BIOLOGICKOM LABORATÓRIU

Amoniak (NH_3) je značne prchavý. Pary leptajú sliznicu a vo vysokých koncentráciách môžu pôsobiť smrteľne. Postihnutý potrebuje úplný pokoj a pobyt na čerstvom vzduchu. Pri nadýchaní, či požití, je nutné podávať veľké množstvo vody s octom alebo citrónom, neskôr olivový olej s kúskami ľadu. S amoniakom sa pracuje vždy v zapnutom digestore.

Chlór (Cl_2) a **bróm** (Br_2) silne leptajú dýchacie orgány. Ich účinky sa prejavujú až po niekoľkých hodinách (kašeľ, dusenie). Postihnutý sa preniesie na čerstvý vzduch, zaistí pokoj, nenúti sa ho dýchať zhlboka a nikdy sa neposkytuje umelé dýchanie. Je možné vdychovať vodnú paru s amoniakom alebo etanolom, či 2 % (w/v) roztokom sódy. Asanácia rozliateho brómu sa uskutočňuje tiosíranom.

Kyanovodík (HCN) a **kyanidy** (CN^-) sú prudko jedovaté látky mandľového zápachu. Pary kyanovodíka spôsobujú i v nízkych koncentráciách okamžitú smrť. Plyn preniká pokožkou. Pri práci s kyanovodíkom sa vždy používa plynová maska. Pri otrave je nutná okamžitá lekárska pomoc. Dlhodobu sa zavádza umelé dýchanie, poprípade sa zabezpečí vdychovanie kyslíka. Kyanidy pôsobia ako inhibítory dýchacieho reťazca mitochondrií. Smrteľná dávka je zhruba 200 mg. Pri otrave je potrebné okamžite vypláchnuť žalúdok a vyvolať zvracanie, pričom sa podáva zriedený peroxid vodíka. Injekčne sa podáva metylénová modrá a tiosíran. Pary kyanovodíka sa uvoľňujú v kyslom prostredí z kyanidov.

Oxid uhoľnatý (CO) je prudko jedovatý plyn, ktorý nie je možné zistiť čuchom. Vytláča kyslík z väzobných miest na hemoglobíne. Už po krátkom čase vdychovania otupuje a spôsobuje smrť zadusením. Postihnutého je potrebné vyniesť na čerstvý vzduch a zavádza sa umelé dýchanie s inhaláciou kyslíka.

Nitrózne plyny (napr. oxid dusnatý, NO ; oxid dusitý, N_2O_3 ; oxid dusičitý, NO_2 ; oxid dusičný, N_2O_5) môžu spôsobiť i pri vdýchnutí malého množstva smrť. Postihnutého je treba nechať vdychovať voľne kyslík a privoniať amoniak. Nezavádza sa umelé dýchanie a je potrebné zabezpečiť absolútny pokoj.

Oxid siričitý (SO_2) vyvoláva pri vdychovaní kŕčovitý kašeľ. Postihnutého je potrebné preniesť na čerstvý vzduch, popr. ho nechať vdychovať pary etanolu alebo kyslík.

Sulfán (sírovodík; H_2S) je prudko jedovatý plyn. Pri nadýchaní je potrebné postihnutého ihneď vyniesť na čerstvý vzduch. Ak dôjde k otrave a sťaženiu dýchania, je nutné okamžite inhalovať kyslík a zavádzať umelé dýchanie i pri zdanlivej smrti.

Ortuť (Hg) je jedovatá nielen vo svojich zlúčeninách, ale i v parách a prachu. Pri otrave je potrebné podávať prostriedky na zvracanie (mydlová voda) a vypláchnuť žalúdok. Potom podávať bielok v mlieku, vodnú suspenziu horčička s mandľovým olejom, roztok tanínu alebo železný prach. Pri rozliatí asanovať malé kvapôčky sírnym kvetom (prášková forma síry) alebo pozbierať mosadzným plieškom. Pri rozbití ortuťového teplomeru je nutné vždy riadne odstrániť všetku ortuť z prostredia, nakoľko môže spôsobovať v laboratóriu dlhodobé otravy.

Olovo (Pb) je nebezpečné v parách a jeho zlúčeniny spôsobujú dlhodobu chronickú otravu, tzv. saturnizmus. Po požití je treba podávať veľké množstvo roztoku síranu horečnatého (MgSO_4), vyvolať zvracanie a potom podávať mlieko a vodu s bielkom. Po práci s kovovým olovom je nutné si vždy poriadne opláchnuť ruky.

Metanol (CH_3OH) pôsobí škodlivo tak vdychovaním pár, ako aj požitím. V prvej fáze vyvoláva opojenie, neskôr kŕče. Väčšie dávky spôsobujú trvalé oslepnutie a smrť. Na rozdiel od etanolu sa veľmi dobre vstrebáva pokožkou. Pri práci s metanolom sa preto vždy pracuje v ochranných rukaviciach. Pri požití metanolu sa ako antidotum (protijed) podáva etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), ktorý je oveľa lepším substrátom pre ľudskú alkoholdehydrogenázu a zabraňuje tak tvorbe toxického formaldehydu (HCHO) z metanolu.

Benzén, toluén a naftalén (C_6H_6 , C_7H_8 , C_{10}H_8) pôsobia škodlivo na červené krvinky. Pri požití sa vyvoláva zvracanie. Je nutný pokoj, popr. umelé dýchanie.

Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) je značne toxická látka leptajúca kožu, ktorou sa rýchlo vstrebáva a spôsobuje celkovú intoxikáciu. Postriekaná koža sa oplachuje 25 % (v/v) etanolom alebo glycerolom. Pri práci s fenolom sa vždy pracuje v rukaviciach.

Zvlášť nebezpečnou skupinou látok, s ktorými je možné sa v chemickom laboratóriu stretnúť, sú látky **mutagénne** a **karcinogénne**. Ich nebezpečnosť spočíva v tom, že nespôsobujú akútnu otravu, ale dlhodobým pôsobením môžu vyvolať nádorové ochorenie. Pri práci s týmito látkami sa pracuje vždy podľa daných predpisov a s ochrannými pomôckami. Medzi karcinogény, ktoré sa často používajú v biochemickom laboratóriu, patrí **benzén** (C_6H_6), **styrén** (C_8H_8), **chloroform** (trichlórmétán, CHCl_3), **etídiumbromid** ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$) a **akrylamid** ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$).

Pri práci s **infekčným materiálom** je nutné zachovávať všetky hygienicko-preventívne opatrenia, aby nedošlo k nákaze. Za potenciálne infekčný materiál je nutné považovať všetky telesné tekutiny (moč, sliny, krv) a živočíšne tkanivá, prípadne extrakty z nich pripravené.

Kontrolné otázky

1. Ako sa v biologickom laboratóriu pracuje s amoniakom a prečo?
2. Ako sa asanuje vyliaty bróm?
3. Čo viete o negatívnych účinkoch kyanovodíka na ľudský organizmus?
4. Je oxid uhoľnatý toxický pre ľudský organizmus? Ak áno, prečo?
5. Môžu byť nitrózne plyny pre ľudský organizmus škodlivé?
6. Aké postupy platia pri asanácii ortuti v biologickom laboratóriu?
7. Aký je vplyv metanolu na ľudský organizmus?
8. V čom spočíva nebezpečenstvo mutagénnych a karcinogénnych látok?
9. Vymenujte aspoň tri karcinogénne látky v biologickom laboratóriu.
10. Ako sa postupuje pri práci s infekčným materiálom a čo všetko sa za infekčný materiál môže považovať?

LABORATÓRNY DENNÍK

Laboratórny denník je určený na zachytenie všetkých aspektov uskutočňovaného experimentu. Pre lepšiu orientáciu v ňom je vhodné, aby jednotlivé stránky v denníku boli číslované. Do laboratórneho denníka je potrebné pred uskutočnením laboratórneho cvičenia napísať domácu prípravu z poskytnutých podkladov, ktorá sumarizuje všetky informácie potrebné na bezproblémový priebeh laboratórneho cvičenia, vrátane cieľa práce, postupu spísaného vo forme textu, blokovej schémy alebo odrážok, výpočtov potrebných na prípravu všetkých roztokov a reagensí nutných pre vykonanie samotného cvičenia, s uvedením ich predpokladanej spotreby (aj tých, ktoré sú v laboratóriu pripravené) a návrh tabuliek na zaznamenanie plánovaných výsledkov, ktoré je počas cvičenia cieľom namerať. **Bez tejto prípravy nebude možné cvičenie absolvovať.**

Do laboratórneho denníka sa počas experimentu zaznamenáva pozorovanie, parciálne výsledky, výpočty a závery vyplývajúce z daného experimentu. Študent sa nespolieha na pamäť a rôzne lístočky (prípadne plášt'), kam zapisuje priebežne namerané údaje alebo pozorovania.

PRACOVNÉ PROTOKOLY

Protokol vypracováva každý študent samostatne a odovzdáva ho vždy do týždňa (pred vypracovaním ďalšej úlohy). Protokol študent vypracuje na voľné listy papiera formátu A4 podľa prílohy. Je vhodné protokol tlačiť farebne a obojstranne. Protokol by mal byť stručný, výstižný a prehľadný, bez zbytočných duplicit a mal by obsahovať nasledujúce časti:

- 1. Titulná hlavička** – podľa vzoru v prílohe obsahuje základné informácie ako názov predmetu a cvičenia, školský rok, dátum laboratórneho cvičenia, meno a študijný odbor študenta a podobne.
- 2. Cieľ práce** – presná definícia, čo je cieľom danej práce, cvičenia, čo chceme cvičením dosiahnuť, zistiť.
- 3. Pracovný postup** – podrobne vlastnými slovami (v minulom čase, množnom čísle) popísať čo a ako bolo v skutočnosti vykonané, vrátane odchýlok od návodu, presných návažkov, použitých prístrojov, pomôcok, podmienok merania a podobne – teda tak, aby bolo možné podľa protokolu experiment presne reprodukovať. Je nutné dodržať počet platných desatinných miest – návažok 0,1 g nie je to isté ako 0,10 g!
- 4. Výpočty** – návažky, riedenie roztokov, príprava roztokov a podobne nutné k postupu (vrátane vzťahov a vzorcov potrebných pre spracovanie nameraných hodnôt).
- 5. Výsledky** (+ ich vyhodnotenie, grafy) – (iba) to, čo bolo pozorované alebo namerané, prípadne, čo študent z nameraných hodnôt vypočítal (teda NIE ako sa experiment „mal vyvíjať“, to bude súčasť diskusie). Výsledky sa uvádzajú čo najprehľadnejšie, najlepšie formou tabuľky, obrázkom a prípadne iným grafickým znázornením.

Tabuľky

- Názov tabuľky je vždy nad samotnou tabuľkou a je z neho zrejmé, aké údaje tabuľka obsahuje.
- Každá tabuľka je číslovaná a v texte protokolu musí byť odvolanie sa na príslušnú tabuľku pri interpretácii výsledkov.
- Tabuľka musí obsahovať hlavičku, v ktorej je jasne definované, akú údaje sa v tabuľke nachádzajú. Dôležité je uvádzať pri všetkých hodnotách aj jednotky.

Grafy a obrázky musia mať všetky potrebné náležitosti:

- Názov, z ktorého je presne zrejmé, bez potreby čítania ďalšieho textu, o čo sa jedná, čo obrázok alebo graf znázorňuje. Názov a bližší popis grafickej závislosti uvádzajte pod grafom.
 - Súradnicové osi s riadnym popisom, t. j. označenie nanášanaj veličiny, vrátane príslušnej jednotky (na osi x nezávisle premenná (veličina, ktorú experimentátor sám mení – napr. koncentrácia roztoku), na osi y závisle premenná (veličina, ktorá vyplýva (závisí) z experimentu - napr. absorbancia).
 - Meradlo, t. j. rovnomerne vynesená stupnica v lineárnom rozsahu (ak nie je nutné iné). Pri zostrojovaní grafu sa volí na osiach vhodný rozsah (napr. keď sa pracuje v zásaditej oblasti pH, t. j. v rozsahu 7 - 11, je nezmyselné, aby os začínala nulou), je vhodné teda využiť čo najväčšiu možnú plochu grafu pre zobrazenie danej závislosti.
 - Hodnotu vypočítanú/určenú z nameraných hodnôt je potrebné zaokrúhliť s ohľadom na presnosť použitých meracích metód. To znamená, že počet platných desatinných miest výsledku by mal rešpektovať najmenej presnú hodnotu zo všetkých, z ktorých do vzorca dosadzujete – napr. je nutné zväžiť, ako presná bola koncentrácia kalibračných roztokov, ako presné boli pipetované prídavky činidla. Zvyčajne sa tak uvádza výsledok na dve, tri, maximálne na štyri platné čísla.
- **Diskusia** - zhodnotenie dosiahnutých výsledkov a vysvetlenie, čo z výsledkov vyplýva. Diskusiu tvorí aj konfrontácia pôvodne plánovaných postupov a realizovaných (zmeny spôsobené napr. nefunkčným prístrojom alebo inými použitými roztokmi) a porovnanie, nameraných alebo vypočítaných hodnôt s údajmi teoretickými získanými z literatúry alebo adekvátnych internetových zdrojov, teoreticky vypočítanými a podobne, vrátane odôvodnenia prípadných odchýlok.
- 6. Záver** - stručná odpoveď na stanovený cieľ práce, čo z nameraných výsledkov vyplýva.

Kontrolné otázky

1. Čo je náplňou laboratórneho denníka?
2. Je laboratórny denník nevyhnutný pre absolvovanie laboratórneho cvičenia?
3. Aké základné časti by mal obsahovať pracovný protokol? Vymenujte ich.
4. Ako by ste charakterizovali pracovný postup?
5. Čo všetko musí obsahovať tabuľka?
6. Kde sa píše názov grafu, príp. obrázku?
7. Aká je charakteristika diskusie laboratórnom protokole?
8. O čom pojednáva záver?
9. Na čo slúži v protokole teoretický úvod?
10. Definuj pojem „laboratórne pomôcky“ v protokole.

VYBAVENIE BIOLOGICKÉHO LABORATÓRIA

Sklo

Medzi laboratórne sklo sa zaraďuje sklenený laboratórny materiál, s ktorým sa stretávame v biologickom laboratóriu. Laboratórne sklo má vysokú odolnosť voči minerálnym kyselinám a zásadám. Výnimku tvorí len kyselina fluorovodíková (HF), v ktorej sa sklo rozpúšťa, pretože oxid kremičitý (SiO_2), ktorý je hlavnou zložkou skla, reaguje s touto kyselinou. Z fyzikálnych vlastností skla je najdôležitejšia jeho tepelná rozťažnosť. Všeobecne majú sklá mäknúce pri vyšších teplotách väčšiu odolnosť proti náhlym tepelným zmenám. V laboratóriu sa pracuje predovšetkým s tromi druhmi skla:

- 1. Mäkké sklo (sodno-draselno-vápenaté)** – používa sa na výrobu nádob, ktoré nie sú vystavované tepelnému namáhaniu. Má veľký koeficient rozťažnosti, takže neznesie kolísanie teploty. Musí sa zahrievať alebo ochladzovať veľmi opatrne. Má nízky bod topenia ($550\text{ }^\circ\text{C}$) a preto sa dá jednoducho roztaviť v plameni nad kahanom. Zmäknuté sklo sa potom dá ľahko opracovať. Na reze má charakteristické modrozelené zafarbenie. V laboratóriu sa používajú sklenené predmety vyrobené z tohto typu skla akými sú napríklad trubičky, tyčinky, hodinové sklíčka, tabuľové sklo, obalové sklo a podobne.
- 2. Tvrdé sklo (borosilikátové)** – slúži na výrobu sklenených nádob, ktoré môžeme zahrievať priamo nad plameňom. Zhotovuje sa z neho väčšina varného a odmerného skla. Borosilikátové sklo má žltozelenú farbu a vyznačuje sa odolnosťou proti praskaniu, vysokým bodom topenia ($700\text{ }^\circ\text{C}$) a vysokou chemickou odolnosťou. Najbežnejšie obchodné značky sú Sial, Simax, Duran alebo Pyrex.
- 3. Kremenné sklo** – vyznačuje sa vysokou chemickou a tepelnou odolnosťou (teplota topenia $> 1400\text{ }^\circ\text{C}$). Je bezfarebné, má veľmi nízky koeficient tepelnej rozťažnosti v porovnaní s inými druhmi skla a v dôsledku toho vydrží prudké tepelné zmeny bez porušenia. Je však veľmi krehké a využíva sa výhradne na zhotovovanie špeciálnych nádob a zariadení, akými sú napríklad kyvety pre spektrofotometriu (prepúšťa UV žiarenie).

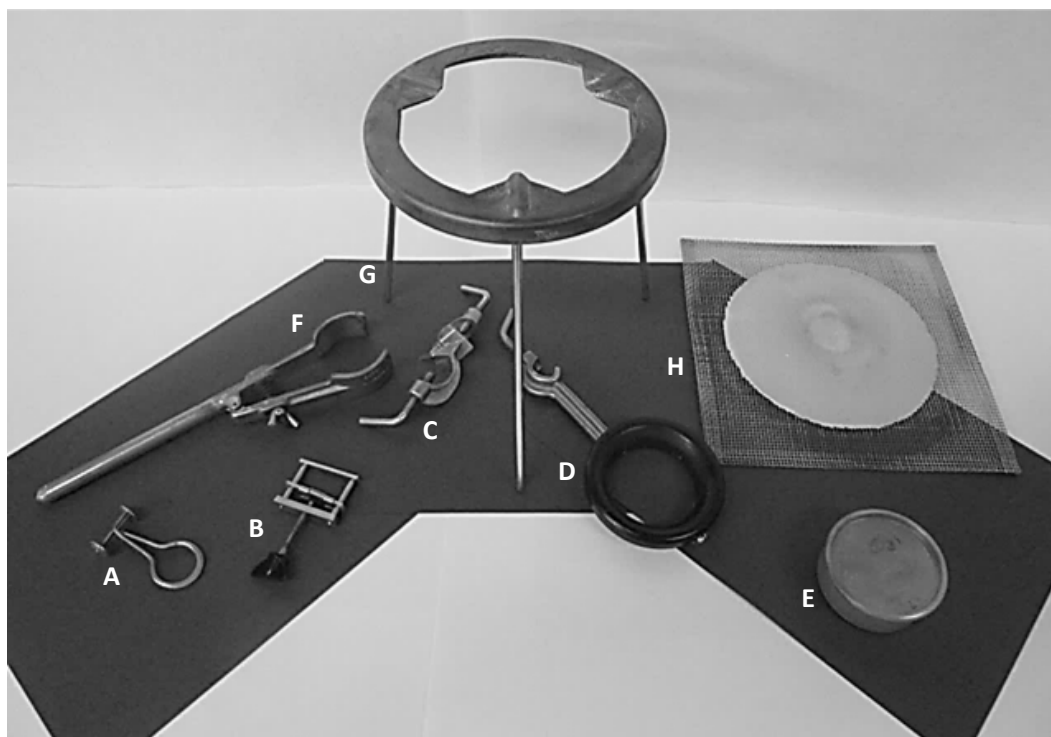
Všeobecnou vlastnosťou skla je jeho krehkosť. Zbytočnému praskaniu sa zamedzí riadnym uchytením do svoriek a lapákov s čeľuštami s korkovou výstužou, poprípade s navlhčenými gumovými hadičkami. Pri práci s agresívnymi látkami alebo vákuom, nie je vhodné používať korok a gumové hadice. V takomto prípade sa pracuje so zábrusovým sklom, ktoré sa dá vzájomne stavebnicovo prepojovať. Zábrusové banky, chladiče, teplomery, zátky atď. sú normované. Najčastejšie rozmery normovaných zábrusov (NZ) sú NZ 14,5/15; NZ 29/32; NZ 40/45. Čísla predstavujú priemer zábrusu v mm v zúženej a rozšírenej časti. Práca so zábrusmi je rýchla a pohodlná. Zábrusy je však potrebné vždy natrieť silikónovou vazelinou, aby nedochádzalo k ich zlepeniu.

Porcelán

Popri sklenených nádobách sa používajú v chemickom laboratóriu veľmi často nádoby a pomôcky z porcelánu (trecie a odparovacie misky, žihacie tégliky, navažovacie lodičky, lyžičky, Büchnerove lieviky). Tvrdý chemický porcelán má vysokú mechanickú a chemickú odolnosť. Je citlivý na údery a ľahko sa triešti hlavne pri prudkých zmenách teploty. Je stály a odolný voči vzdušnému kyslíku i pri vysokej teplote. Povrchom neviaže vodu a je v nej i za vysokej teploty nerozpustný. Chemickým činidlám odoláva minimálne tak dobre ako chemické sklo. Chemický porcelán môže byť drsný alebo glazúrovaný. Glazúra jeho vlastnosti výrazne neovplyvňuje.

Kovové pomôcky

Kovy a zliatiny kovov sa používajú v chemickom laboratóriu ako všeobecný konštrukčný materiál. V porovnaní so sklom majú kovy vysokú mechanickú pevnosť, nie sú krehké, majú podstatne vyššiu tepelnú a elektrickú vodivosť a tepelnú rozťažnosť. Kovové nádoby a aparatury sa používajú všade tam, kde sa nemôže využiť sklo, porcelán, prípadne kremenné sklo. Z kovov a zliatin sa vyrábajú laboratórne stojany, svorky, lapáky, žihacie a filtračné kruhy, trojnožky, tégliky, pinzety, tlačky, kahany a iné (Obrázok 1). Pre špeciálne aplikácie sa používajú nádoby a pomôcky z rôznych kovov (zlato, platina, striebro, nikel, meď, chróm a pod.).



Obrázok 1: Laboratórne kovové pomôcky. A – Mohrova tlačka, B – Hoffmanova tlačka, C – svorka, D – filtračný kruh, E – hliníková vysúšačka, F – lapák, G – trojnožka a H – azbestová sieťka.

DELENIE POMÔCOK VZHĽADOM NA ICH ÚČEL

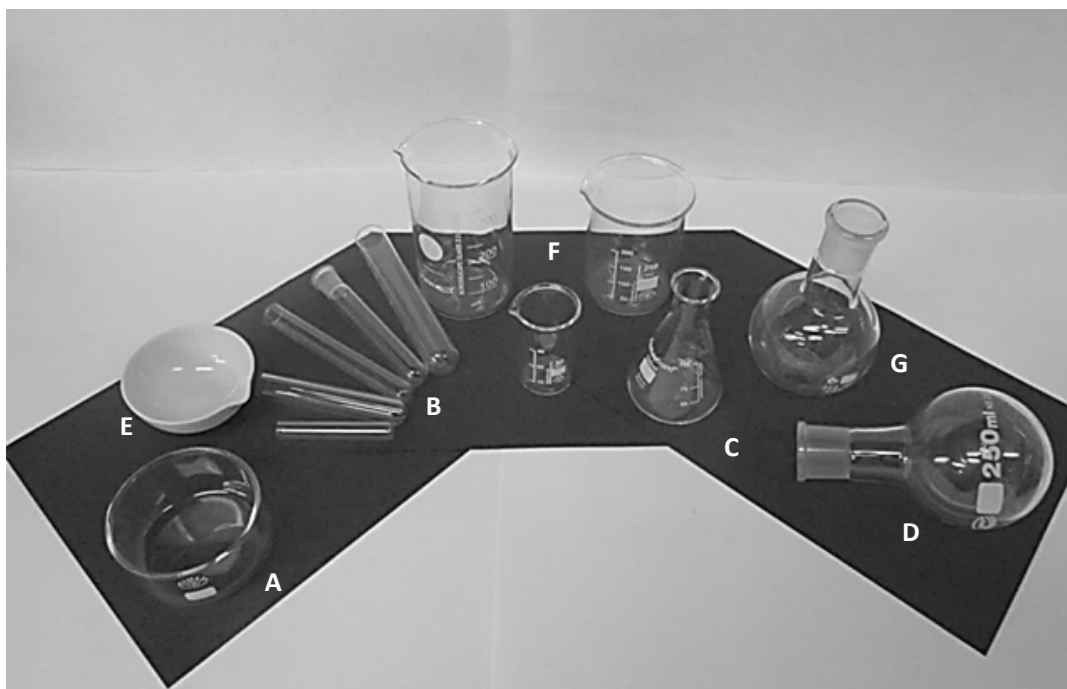
Laboratórne pomôcky podľa účelu a uplatnenia je možné rozdeliť na varné sklo, odmerné sklo, sklo na uchovávanie chemikálií, chladiče, lieviky a ostatné druhy laboratórných pomôcok.

Varné sklo

Do tejto skupiny laboratórneho skla sa zaraďujú základné sklenené nádoby používané v chemických laboratóriách, medzi ktoré patria kadičky, varné banky, destilačné banky, frakčné banky, Erlenmeyerove banky, skúmavky, kryštalizačné a odparovacie misky (Obrázok 2).

Kadičky majú rovné dno a na hornom okraji môžu mať zobáčik. Môžu by i kalibrované, ale táto kalibrácia slúži iba na orientačné účely a rozhodne podľa nej nie je možné odmeriavať presné objemy. Varné sklo slúži na bežné chemické a fyzikálno-chemické operácie, napríklad neutralizáciu, zrážanie, rozpúšťanie, odparovanie a pod. Môžu sa v ňom zohrievať alebo variť roztoky alebo kvapaliny.

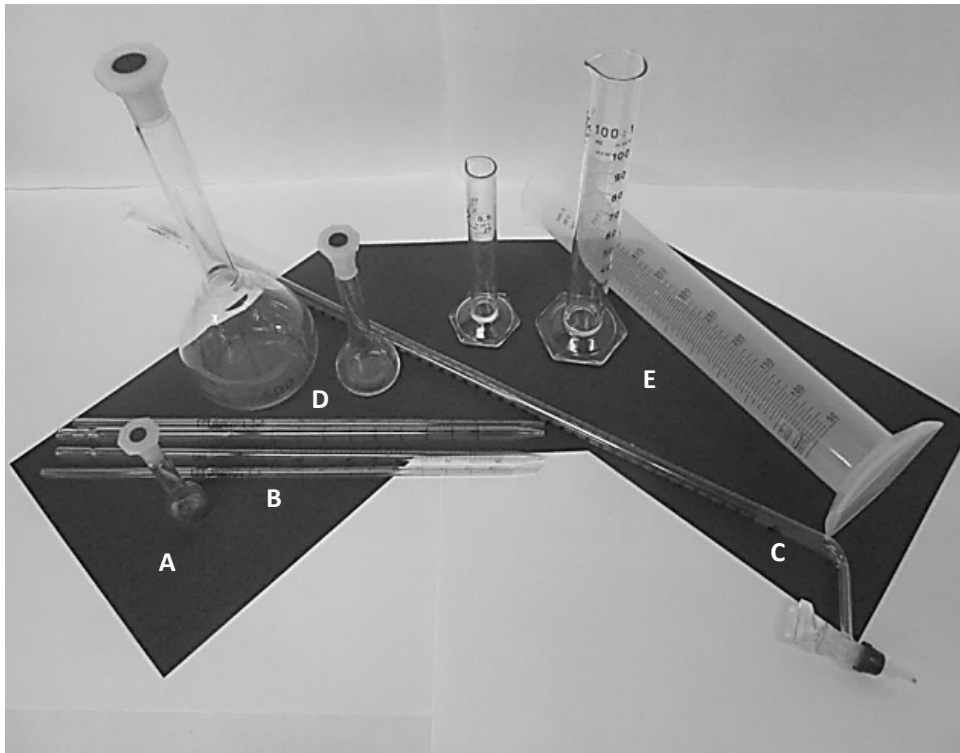
Banky majú tvar členitejší, rozdelený na vlastnú banku a hrdlo. Dno môžu mať tak rovné, ako aj guľaté. Zatiaľ čo sa banky s plochým dnom (varné banky) používajú na zahrievanie zmesí pri laboratórnom tlaku, banky s guľatým dnom sú určené na prácu za zníženého tlaku (napr. destiláciu). Banku s guľatým dnom a postranným tubusom nazývame frakčnou bankou. Táto sa v minulosti používala na zostavovanie destilačných aparátov, pričom postranný tubus slúžil práve na prepojenie banky s chladičom.



Obrázok 2: Varné sklo. A – kryštalizačná miska, B – rôzne typy skúmaviek, C – Erlenmeyerova banka, D – destilačná banka so zábrusom, E – odparovacia miska, F – kadičky s rôznym objemom, G – varná banka so zábrusom.

Odmerné sklo

Do tejto skupiny laboratórneho skla sa zaraďujú odmerné valce, odmerné banky, pipety a byrety (Obrázok 3). Odmerné sklo slúži na odmeranie objemu kvapalín, resp. na ich presné dávkovanie. Objem odmerného skla je kalibrovaný pri určitej teplote, bežne pri laboratórnej teplote (20 °C). **Odmerné valce** slúžia na približné odmeranie objemu kvapalín a sú kalibrované na naliatie, čo znamená, že pri ich naplnení obsahujú práve požadovaný objem. **Odmerné banky** slúžia na prípravu roztokov s presnou koncentráciou, dopĺňajú sa po značku a sú kalibrované taktiež na naliatie.



Obrázok 3: Odmerné sklo. A, D – odmerné banky (10, 50 a 500 ml), B – pipety s rôznym objemom, C – byreta, E – sklenené a plastové odmerné valce.

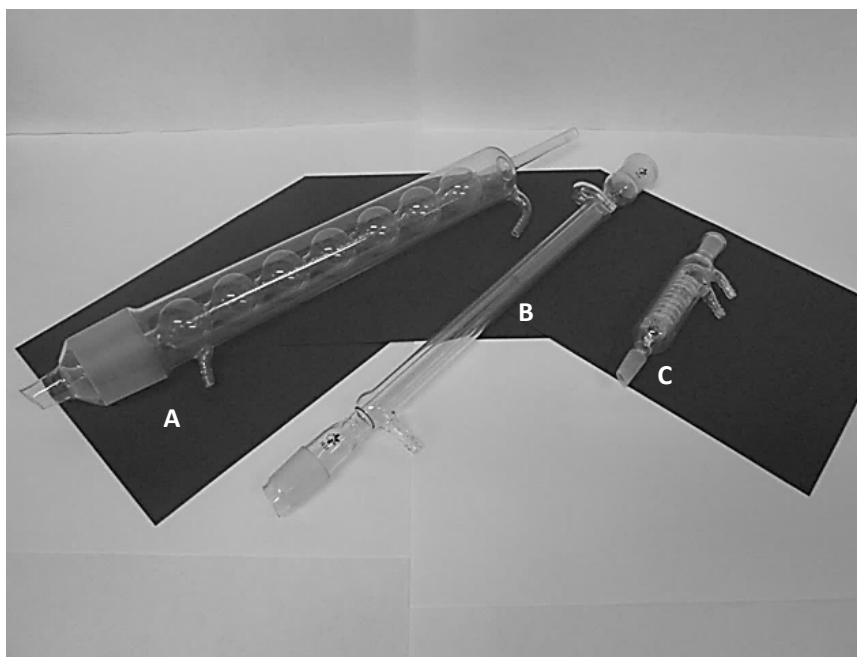
Pipety slúžia na veľmi presné dávkovanie, t. j. odmeranie určitého objemu, ktorý zodpovedá vyznačenému objemu pipety (nedelené pipety). Delené pipety sú určené na presné dávkovanie čiastkových objemov, nižších ako je celkový objem pipety. Tieto sú kalibrované na vyliatie s tým, že v kónickom konci pipety zostáva určitá časť pipetovaného roztoku, čo je zohľadnené už pri jej kalibrácii výrobcom. Preto sa pri vypúšťaní roztoku z pipety zostávajúci roztok nevyfukuje. Pipety sa naplňajú nasávaním roztoku po nulovú hodnotu vyznačenú na stupnici pipety. Všetky druhy roztokov, ktoré nie sú zdraviu škodlivé, je principiálne možné nasávať ústami, avšak vzhľadom na možnosť kontaminácie skla počas inej práce v laboratóriu, sa nasávanie roztoku do pipety ústami neodporúča. Vhodnejšie je

použiť gumené balóniky alebo iné manuálne, semiautomatické alebo automatické zdroje podtlaku.

Byrety slúžia na veľmi presné dávkovanie čiastkových objemov a sú kalibrované na vyliatie. Najmenší objem, ktorý je možné dávkovať byretou, je jedna kvapka, ktorá predstavuje v závislosti od tvaru a veľkosti výpustného tubusu približne 0,03 ml. Byrety sa naplňujú dolievaním alebo pod tlakom (automatické byrety) po nulovú hodnotu vyznačenú na stupnici byrety. Vyprázdňujú sa vplyvom gravitácie cez sklenený alebo teflónový kohút.

Chladiče

Slúžia na kondenzáciu pár. V podstate každý chladič je trubica v trubici pevne spojená, pričom jedna trubica tvorí kondenzačnú časť (obvyčajne vnútorná) a druhá chladiacu časť – chladiaci plášť (obvyčajne vonkajšia). Známe sú tri základné druhy chladičov zoradené vzostupne podľa chladiaceho účinku: Liebigov, guľôčkový a špirálový (Obrázok 4).



Obrázok 4: Chladiče. A – guľôčkový chladič, B – Liebigov chladič, C – špirálový chladič.

Sklo na uchovávanie chemikálií

Prachovnice slúžia na uchovávanie tuhých látok. Majú široké hrdlo, čo umožňuje ľahkú manipuláciu so skladovanými látkami. Uzávery prachovnic môžu byť zábrusové alebo závitové.

Reagenčné fľaše sa používajú na uchovávanie kvapalných látok. Majú úzke hrdlo so zábrusovým, závitovým alebo zátkovým uzáverom. Na uchovávanie malých množstiev pevných látok používame liekovky (Obrázok 5).

Lieviky

Slovom lievik sa označuje v laboratóriu väčší počet pomôcok (Obrázok 6). **Obyčajné lieviky** slúžia na prelievanie kvapalín a jednoduchú filtráciu. Majú hladké a rovnako hrubé steny. Špeciálny typ lievika, tzv. analytický lievik používaný na filtráciu, má steny vo vrchnej časti hrubé a v dolnej tenšie s výstupkami. **Analytický lievik** má dlhú a tenkú odtokovú trubičku – stopku.



Obrázok 5: Sklo na uchovávanie chemikálií. A – prachovnica, B, D, E, G – reagenčné fľaše, C – vialky, F – zábrusová prachovnica.

Okrem filtračných lievikov je možné do tejto skupiny zaradiť aj **oddeľovacie lieviky**, ktoré sa používajú na rozdelenie dvoch obmedzene miešateľných kvapalín. Tzv. deliace lieviky sa používajú na rad procesov, akými sú extrakcia, sušenie, prikvapkávanie atď. Veľmi často používaným je, z porcelánu vyrobený, **Büchnerov lievik**, ktorý má dierkované dno, a využíva sa pri filtrácii za zníženého tlaku. Podobne sa používajú i sklenené frity, ktoré majú namiesto dierkovaného dna spekané sklo prepúšťajúce kvapalnú látku.

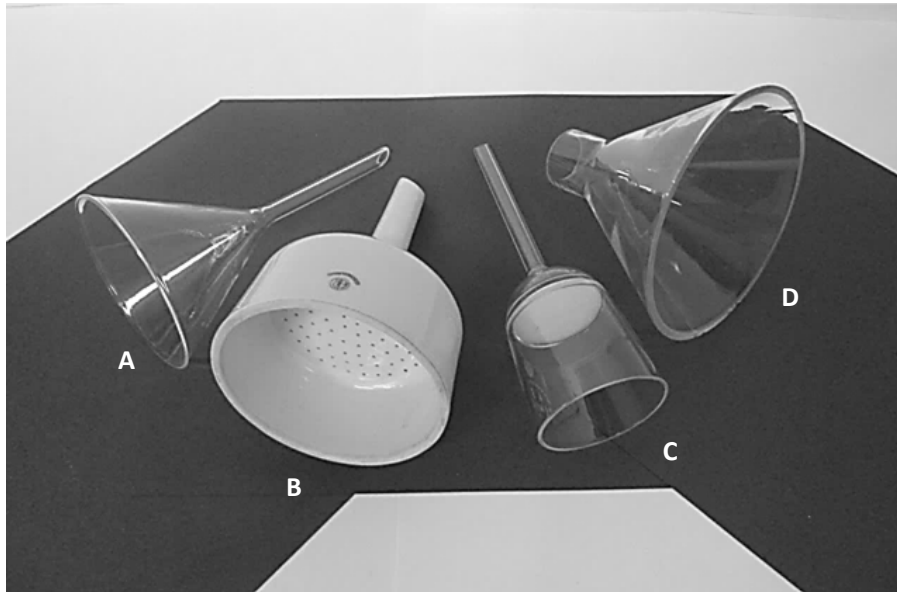
Ostatné

Striekačky sa používajú pri dávkovaní destilovanej vody na zriedovanie roztokov, rozpúšťanie látok, vyplachovanie kadičiek od tuhých látok pri filtrácii a pod. Bežné striekačky sú polyetylénové a sklenené (zložené z varnej banky a špeciálneho uzáveru).

Navážovačky sa používajú na váženie tuhých, prípadne kvapalných látok. Rozdeľujú sa na nádoby a lodičky. Navážovacie nádoby majú zábrusový uzáver, čo umožňuje váženie látky bez vplyvu vonkajších podmienok a taktiež zabraňuje jej prípadnému odparovaniu.

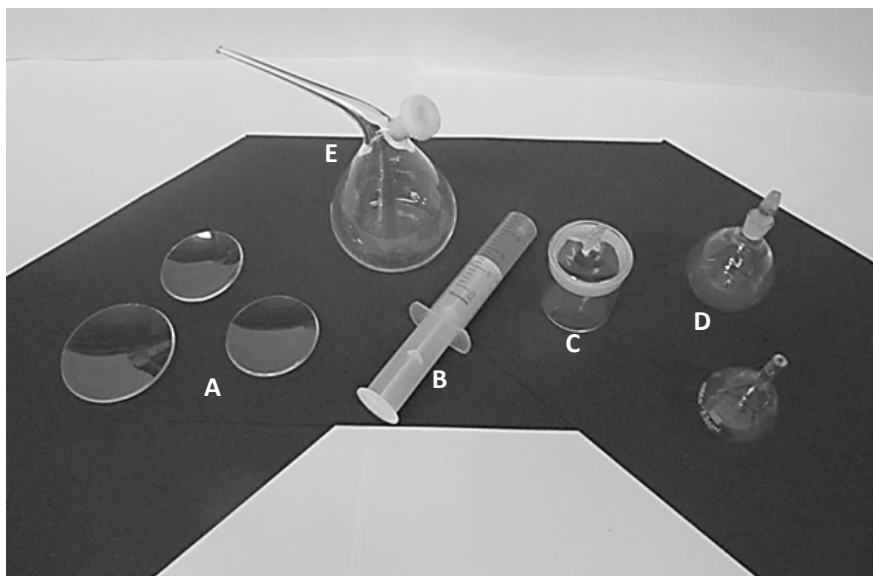
Indikátorové fľaštičky slúžia na precízne dávkovanie indikátorov, napr. pri titrácii.

Pyknometre sa používajú na stanovenie hustoty látok v tuhom a kvapalnom skupenstve vážením. Sú to špeciálne nádoby so zábrusovým uzáverom, v ktorom je otvor. Pyknometre majú vyznačený presný objem pri 20 °C.



Obrázok 6: Lieviky. A – filtračný lievik, B – Büchnerov lievik, C – sklenená frita, D – násypník.

Hodinové sklíčko slúži na prikrytie kadičky, aby sa zabránilo intenzívnemu vyparovaniu rozpúšťadla, na sušenie, váženie a prenášanie vzoriek pevných látok. Analogicky môžeme využívať i dvojdielne Petriho misky, ktoré sa však prioritne používajú pre kultiváciu mikroorganizmov (Obrázok 7).



Obrázok 7: Ostatné pomôcky používané v laboratóriu: A – hodinové sklíčka, B – striekačka, C – navažovačka, D – pyknometre, E – prikvapkávacia banka.

Sklenená tyčinka sa používa pri zmiešavaní roztokov, pri rozpúšťaní tuhých látok, pri filtrácii a podobne.

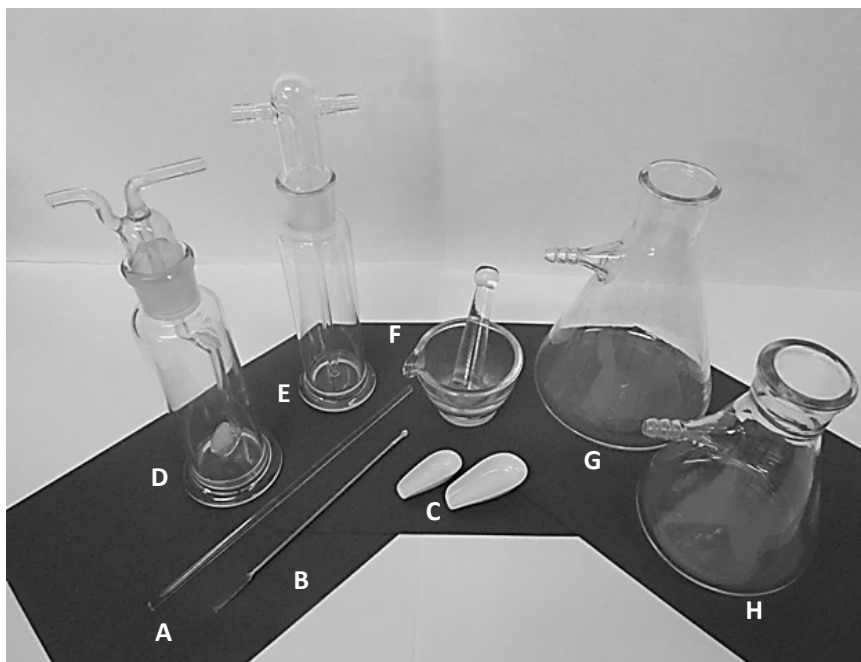
Laboratórne lyžice alebo **špachtle** sa používajú na dávkovanie tuhých látok, najmä pri odoberaní zo zásobnej prachovnice a pri vážení.

Keramické lodičky sa používajú na žiňanie tuhých látok pri vysokých teplotách. Bežné keramické lodičky sú porcelánové a korundové (korund je spekaný oxid hlinitý; Al_2O_3).

Trecie misky slúžia na rozotieranie (zjemnenie zrnitosti tuhých látok). Sú to hrubostenné nádoby s roztieradlom. Vyrábajú sa z porcelánu, achátu (achát je prírodný minerál s hlavnou zložkou oxidom kremičitým – kremeň) a skla.

Odsávací banka sa používa pri filtrácii za zníženého tlaku. Slúži na zachytávanie filtrátu. Odsávací banka je vlastne hrubostenná Erlenmeyerova banka s bočným tubusom na pripojenie zdroja podtlaku (vývevy, vákuová pumpa).

Premývačky slúžia na sušenie plynov ich premývaním cez sušiacu látku napríklad koncentrovanú kyselinu sírovú (H_2SO_4), oxid fosforečný (P_2O_5), oxid vápenatý (CaO), silikagél a pod. Používajú sa aj ako bezpečnostné uzávery proti spätnému prenikaniu kvapalín do chemických aparatúr vplyvom podtlaku (Obrázok 8).



Obrázok 8: Ostatné pomôcky používané v laboratóriu: A – sklenená tyčinka, B – špachtľa, C – lodička, D – premývačka s fritou, E – premývačka, F – trecia miska, G, H – odsávačka.

Odparovacie misky bývajú väčšinou vyrobené z porcelánu. Používajú sa pri odparovaní rozpúšťadla na vzdušnom alebo vodnom kúpeli. Nie sú vhodné k priamemu zahrievaniu nad plameňom.

Vodná výveva slúži ako zdroj podtlaku vytváraného vodou prúdiacou cez úzky otvor výtokovej trubice do zúženého prierezu plášťa. Vyrába sa zo skla, kovov a z plastov.

ČISTENIE SKLA

Čistota laboratórneho skla je nevyhnutnou podmienkou bezpečnej a úspešnej práce v laboratóriu. Chemické nádoby sa čistia ihneď po práci, kým nečistoty a zvyšky chemikálií na stenách nezaschnú. Spravidla postačujú postupy známe z domácností (saponátový prostriedok a dôkladné opláchnutie vodou). V laboratóriu je nutné v poslednom kroku laboratórne sklo poriadne vypláchnuť destilovanou vodou. Ak na stenách zostali časti vo vode nerozpustných nečistôt, použijú sa mechanické čistiace pomôcky, akými sú kefy, útržky filtračného papiera alebo jemný piesok. Toto mechanické čistenie však nesmie sklo poškriabať, pretože i nepatrné škrabnutie môže spôsobiť pri zahrievaní prasknutie skla. Keď ani mechanické čistenie nevedie k odstráneniu nečistôt, prichádza na rad chemické čistenie. Na čistenie chemického skla je možné použiť rozpúšťadlo, ktoré čistý materiál neskorojuje a súčasne v ktorom je nečistota rozpustná. Najčastejšie sa využívajú v laboratóriu dostupné minerálne kyseliny. Pri čistení laboratórneho skla minerálnymi kyselinami je nevyhnutné dodržiavať bezpečnostné pokyny s tým súvisiace a používať ochranné pomôcky. Vysokú čistiacu schopnosť má tzv. kyselina chromsírová (zmes 200 ml nasýteného roztoku dichromanu draselného, $K_2Cr_2O_7$, 150 ml koncentrovanej kyseliny sírovej, H_2SO_4 a 100 ml

destilovanej vody). Sklo sa do tejto zmesi namočí počas noci a ráno sa potom dôkladne opláchne v roztoku detergentu, pod tečúcou vodou a nakoniec v destilovanej vode. Chromsírová zmes sa po čase vyčerpá, čo sa prejaví zeleným sfarbením (redukcia dvojchromanu na chromitý ión). Takáto zmes je potom málo účinná a musí sa pripraviť nová. V krajných prípadoch je možné použiť tzv. lúčavku kráľovskú (roztok kyseliny dusičnej (HNO_3) a kyseliny chlorovodíkovej (HCl) v pomere 1:3, v/v). Inou alternatívou je využiť na čistenie skla zásady. Príkladom môže byť zmes izopropanolu (2-propanol, izopropylalkohol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) s hydroxidom sodným (NaOH). Vyčerpanosť čistiacej schopnosti tejto zmesi sa prejaví stmavnutím roztoku.

Kontrolné otázky

1. S akými druhmi laboratórneho skla sa stretávate v laboratóriách?
2. Uveďte tri príklady laboratórnych nádob a pomôcok vyrobených z porcelánu.
3. Uveďte rozdiel medzi varným a odmerným sklom.
4. Uveďte tri príklady laboratórneho skla, ktoré sa zaraďuje medzi odmerné sklo.
5. Na čo slúžia chladiče? Vymenujte tri základné druhy chladičov.
6. Na čo slúžia odparovacie a trecie misky?
7. Uveďte spôsob využitia pre nasledujúce laboratórne pomôcky: Büchnerov lievnik, oddeľovací lievnik, pyknometer.
8. Na čo slúžia v biologickom laboratóriu hodinové sklíčko, odsávací banka, premývačka a vodná výveva.
9. Popíšte postup čistenia laboratórneho skla.
10. O čom svedčí stmavnutie roztoku izopropanol + hydroxid sodný?

ZDROJE TEPLA V BIOLOGICKOM LABORATÓRIU

V laboratóriách, do ktorých je zavedený plyn, nám ako zdroj pre zahrievanie môže slúžiť plynový kahan. **Kahan** je jednoduché zariadenie slúžiace na zmiešavanie vzduchu so zemným plynom. Vytvorená zmes sa spaľuje a vytvára na konci trubice plameň. Podľa spôsobu privádzania a zmiešavania plynu so vzduchom, rozlišujeme tri typy kahanov: Bunsenov, Tecluho a Mékerov. Ak je do plynu privádzané dostatočné množstvo vzduchu, horí nesvietivým plameňom. Tento plameň je výhrevnejší ako plameň svietivý, ktorý získame zamedzením prívodu vzduchu. Pri Bunsenovom a Mékerovom kahane sa prívod vzduchu reguluje otáčaním pohyblivého prstenca, ktorý odkrýva alebo zakrýva otvory v tele kahanu. Kahany zapalujeme vždy pri uzavretom prívode vzduchu. V laboratóriu je možné využiť kahan liehový, ktorý ma nižšiu výhrevnosť ako kahany plynové. Výhodou však je jeho veľkosť a jednoduchosť použitia. Je možné ho použiť všade tam, kde potrebujeme vzorky či chemické reakcie zahriať. Používa sa hlavne pri skúmvkových reakciách a pre sterilizáciu nástrojov určených na prácu s mikroorganizmami.

V súčasnosti sa ako hlavný zdroj tepla v chemických laboratóriách využívajú elektrické variče a varné hniezda. Na elektrický varič sa pokladá vždy azbestovú sieťku. Varné hniezda

sa používajú na zahrievanie destilačných baniek. Ide o elektrický varič, v ktorom je elektricky vyhrievaná špeciálna tkanina vytvarovaná do poglobule tak, aby obalila destilačnú banku. Existuje niekoľko typov varných hniezd podľa veľkosti zahrievanej banky. Pri varných hniezdach je možné okrem regulácie príkonu väčšinou regulovať i to, či je banka vyhrievaná iba zo spodnej časti alebo celá. Pri práci s varnými hniezdami je potrebné dávať pozor, aby do hniezda nevnikla kvapalina. Ak k tomu dôjde, okamžite vypnite prístroj. V prípade vniknutia horľavých kvapalín je vysoká pravdepodobnosť vznietenia, preto je potrebné dodržiavať základné pravidlá pri práci s týmto zariadením.

Nakoľko každé priame zahrievanie nádob kladie vysoké nároky na vlastnosti konštrukčných materiálov, je výhodné prenášať teplo z ohrevného zdroja prostredníctvom **kúpeľa**. Podľa materiálu, ktorý tvorí podstatu kúpeľa, je možné ich deliť na vzdušný, vodný, olejový, pieskový, kovový a soľný. Vzdušné kúpele sa veľmi často nepoužívajú vzhľadom na to, že vzduch je zo všetkých materiálov najmenej vodivý. Najjednoduchšou formou vzdušného kúpeľa je prázdna kovová nádoba zahrievaná kahanom alebo varičom.

Najčastejšie používaný je vodný kúpeľ, ktorý je vhodný na zahrievanie látok až do bodu varu vody a na destiláciu kvapalín v riadkoch približne do 80 °C. Najjednoduchším vodným kúpeľom je kuchynský hrniec, ktorý je vyhrievaný elektrickým varičom. V laboratóriu je možné sa stretnúť i so špeciálnymi vodnými kúpeľmi, ktoré majú rôzne nastaviteľné otvory pre zahrievanie odlišne veľkých baniek a odparovacích misiek.

Pre zahrievanie látok nad teplotu varu vody sa najčastejšie používajú olejové kúpele. Náplňou olejového kúpeľa môže byť buď minerálny olej, ktorý je možné používať do teploty 250 °C, alebo silikónový olej použiteľný až do teplôt okolo 400 °C. Vzhľadom na teplotnú rozťažnosť je nutné olejom naplniť nádobu slúžiacu ako nádoba kúpeľa približne do polovice, inak by pri zvýšení teploty mohol olej pretiecť. Pri zahrievaní je vhodné do olejového kúpeľa vždy vložiť teplomer a priebežne kontrolovať teplotu, aby nedošlo k jeho prehriatiu. Obvykle platí, že teplota kúpeľa, má byť o 20 – 30 °C vyššia ako žiadaná teplota reakčnej zmesi. Je dôležité, aby sa do olejového kúpeľa nedostala voda. Pri teplote nad 100 °C by potom došlo k prskaniu a peneniu oleja, ktorý by mohol spôsobiť popáleniny osobe pracujúcej s kúpeľom alebo dokonca požiar.

Soľné a kovové kúpele slúžia na zahrievanie nad 300 °C. Používa sa zmes niekoľkých solí, napr. dusičnan sodný a draselný s bodom topenia 219 °C a zliatiny s nízkou teplotou tuhnutia, ako je Woodov kov (zliatina štyroch kovov, a to cínu, olova, bizmutu a kadmia) s bodom topenia 65 °C. Vždy je však dôležité vybrať banku pred stuhnutím z kúpeľa. Výhodou týchto kúpeľov je vysoká tepelná vodivosť použitých materiálov.

Od používania pieskových kúpeľov sa už v podstate v dnešnej dobe ustúpilo.

Na žihanie a tavenie väčšieho množstva látok nám slúžia elektrické odporové pece. Pre syntézy v prúde plynu alebo reakcie vo vákuu využívame pece trubkové, pre žihanie v téglíkoch nám slúžia téglíkové piecky a pre tavenie väčšieho množstva látok pece muflové. Trubkové pece sa vyznačujú teplotnou uniformitou a využívajú sa na zahrievanie malých vzoriek v uzatvorených trubiciach. Téglíkové pece sa využívajú napr. na tavenie kovov alebo skla v téglíku pri teplotách do 1200 °C. V muflových peciach sa spaľuje materiál väčšinou

v teplotnom rozmedzí 900 °C až 1500 °C. Muflové pece sa využívajú nielen v biologických laboratóriách, ale aj v zdravotníctve a šperkárstve.

Teplomery

Teplota je stavová veličina opisujúca strednú kinetickú energiu častíc. Nultý zákon termodynamiky opisuje teplotu ako veličinu, ktorá má v každom mieste izolovanej sústavy v rovnováhe rovnakú hodnotu. Teplota je makroskopická veličina. Označuje sa T a jej jednotkou podľa SI je Kelvin. V bežnej praxi sa však z praktických dôvodov častejšie používa stupeň Celzia (°C) alebo stupeň Fahrenheita (F).

Rozlišujeme dva spôsoby merania teploty, priamy a nepriamy. Nepriamy je pomocou pyrometra a termografu. Na priame meranie teploty sa používajú termometre, termočlánky a termistory. Na meranie teploty boli prijaté medzinárodné teplotné stupnice definované pomocou bodu tuhnutia a varu vody. Ďalšie pevné body medzinárodnej stupnice sú bod varu síry 444,6 °C, bod topenia striebra 960,8 °C a bod topenia zlata 1062,4 °C. Všetky tieto teploty sú definované za atmosférického tlaku jednej atmosféry (jedna atmosféra sa rovná tlaku približne 101 325 Pa). Teplota sa meria **teplomermi**, ktoré môžu byť dilatčné, odporové alebo založené na termočlánoch.

Dilatačné teplomery využívajú rozťažnosť kvapalných, poprípade pevných či plyných látok. Najčastejšie používané sú teplomery ortuťové. Umožňujú merať teplotu v rozsahu - 38,9 až 650 °C. Na meranie nízkych teplôt sa teplomery plnia toluénom (-80 až 100 °C), etanolom (-100 °C až 70 °C), petroléterom (-150 až 120 °C) či pentánom (-190 až 20 °C). Na meranie vyšších teplôt sa potom používa ako náplň kvapalné gálium (do 1000 °C) a cín (do 1500 °C).

Odporové teplomery využívajú závislosti odporu vodiča na teplote. Týmito teplomermi je možné merať teplotu s presnosťou na tisíciny stupňa.

Termočlánky sú založené na termoefekte (Seebeckov efekt) – dva drôty z dvoch rôznych kovov spojené na oboch koncoch. Pri zmene teploty produkuje termočlánok elektrické napätie, ktoré je priamoúmerné zmenenej teplote. Príkladom najčastejšie používaných termočlánkov je: meď – konštantán (zliatina medi a niklu) (do 600 °C), železo – konštantán (do 900 °C) alebo platina – ródium (do 1600 °C).

Kontrolné otázky

1. Aká je výhoda využívania liehových kahanov v biologickom laboratóriu?
2. Vymenujte dva hlavné zdroje tepla v biologickom laboratóriu.
3. Na čo slúžia kúpele v laboratóriu?
4. Vymenujte aspoň štyri typy kúpeľov.
5. Aký je rozdiel medzi využitím vodného a olejového kúpeľa v biologickom laboratóriu?
6. Kedy sa v laboratóriu využívajú solné a kovové kúpele?
7. Na čo slúžia v biologickom laboratóriu elektrické odporové pece?
8. Popíšte význam muflovej pece v biologickom laboratóriu.

9. Uvedte typy teplomerov využívané na meranie teploty.
10. Popíšte spôsob merania teploty termočlánkom.

VÁKUUM A JEHO ZDROJE

V laboratórnej praxi je potrebné veľmi často pracovať za zníženého tlaku. Znížený tlak – vákuum – sa využíva hlavne pri destilácii, filtrácii alebo sušení t. j. pri procesoch, v ktorých sa vplyvom zníženého tlaku výrazne zvyšuje prchavosť látok alebo odvádzaním plynnej fázy usmerňuje a urýchľuje tok kvapalín. Vákuum je stav uzavretého priestoru, v ktorom je tlak plynu alebo pary nižší ako atmosférický tlak okolitého prostredia.

Zariadenie vytvárajúce vákuum sa nazýva **výveva**. V laboratóriu sa stretávame s výjevami niekoľkých typov líšiacimi sa tlakom, proti ktorému čerpajú, medznou hodnotou vákuu a sacím výkonom. Najjednoduchším typom vývevy je výveva vodná. Jedná sa o zúženú trubicu, ktorou tryská prúd vody. V okolí ústia trysky je vzduch strhávaný v smere prúdu vody, pričom na trubicu je napojená odvodná hadica, ktorá sa druhým koncom napája na evakuovanú aparatúru. Vodná výveva pracuje teda priamo proti atmosférickému tlaku. Medzi vodnou výjevou a vákuovanou aparatúrou sa vždy zaraďuje poistná nádoba. Ak by došlo k poklesu tlaku vody vo vodovodnom potrubí, môže dôjsť k nasatiu vody z vývevy do vákuovanej aparatúry. Okrem vodných výjev poznáme tiež rotačné olejové alebo mechanické vývevy. Základným stavebným prvkom rotačnej olejovej vývevy je rotor so

spätným ventilom, ktorý rozdeľuje priestor medzi rotorom a plášťom na dve časti. Otáčaním rotoru sa jeden priestor zväčšuje a nasáva vzduch a druhý priestor sa zároveň znižuje a vzduch je vytlačovaný za súčinnosti ventilu z vývevy.

Hlavným pravidlom pri práci s vývevou je zavzdušnenie aparatury po skončení práce a až potom nasleduje vypnutie zdroja vákua. Zabráni sa tým vniknutiu vody do aparatury, či nasatiu agresívnych látok do vývevy a jej poškodeniu.

Kontrolné otázky

1. Ako by ste definovali vákuum?
2. Kde sa vákuum využíva?
3. Ako sa nazýva zariadenie vytvárajúce vákuum?
4. Aké sú kritériá rozdelenia vývev?
5. Aký je najjednoduchší typ vývevy v biologickom laboratóriu?
6. Ako by ste popísali vodnú vývevu?
7. Na čo slúži poistná nádoba pri vodnej výveve?
8. Aké iné vývevy, okrem vodnej, poznáte?
9. Na akom princípe pracuje rotačná olejová výveva?
10. Prečo je nevyhnutné zavzdušnenie aparatury vývevy pred vypnutím zdroja vákua?

VODA V LABORATÓRIU

Vzhľadom na to, že obyčajná **vodovodná voda** obsahuje vysokú koncentráciu solí, je použiteľná iba čiastočne v biologickom laboratóriu a je absolútne nepoužiteľná pre biochemické pokusy. Používame ju iba vtedy, keď neprichádza do styku s ostatnými reagensiami ako rozpúšťadlo, napr. na chladenie alebo zahrievanie.

Základným spôsobom úpravy vody je destilácia. Každé biochemické laboratórium býva vybavené vlastným destilačným prístrojom. **Destilovaná voda** postačí pre väčšinu biochemických operácií, ale pre niektoré špeciálne účely nemusí byť jej čistota dostačujúca. Destilovaná voda obsahuje najmä niektoré katióny, ktoré sa do nej dostávajú zo súčastí destilačnej aparatury, skla a elektród. Jej kvalitu je možné zvýšiť opakovanou destiláciou tzv. redestiláciou, ktorá sa uskutočňuje v špeciálnej aparatúre z kremenného skla neuvolňujúceho katióny.

Pre určité špecifické účely, napr. v laboratóriu molekulárnej biológie, sa používa **voda deionizovaná**, ktorá sa ešte následne sterilizuje v autokláve, nakoľko i malá kontaminácia v nej môže spôsobiť odchýlky v meraných parametroch. Príprava deionizovanej vody je založená na kombinácii niekoľkých separačných metód vedúcich k postupnému odstráneniu jednotlivých skupín kontaminantov. Súprava je väčšinou založená na čiastkových separátoroch odstraňujúcich hrubšie nečistoty (filtre), ióny (ionomeniče), nepolárne látky (adsorbent) a ako posledný býva zapojený membránový filter. Niektoré aparatury pracujú i na princípe reverznej osmózy. Jednotlivé filtre je však nutné po niekoľkých mesiacoch používania vymeniť, v dôsledku čoho nie je príprava deionizovanej vody lacnou záležitosťou.

Hlavným kritériom čistoty vody je jej špecifická vodivosť. Pri bežnej destilovanej vode sa pohybuje okolo hodnoty $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Deionizovaná voda máva túto hodnotu ešte o jeden rád nižšiu. Pripravená destilovaná či deionizovaná voda sa skladuje prevažne v plastových nádobách. Sklenené nádoby nie sú pre dlhodobejšie uskladnenie vhodné, pretože sa do vody spätne uvoľňujú niektoré katióny. Ak to podmienky dovoľujú, skladuje sa voda v chlade a v tme, čím sa zabráni možnej kontaminácii autotrofnými organizmami (organizmy, ktoré syntetizujú z jednoduchých minerálnych látok látky organické).

Kontrolné otázky

1. Je vodovodná voda vhodná pre prácu v biologickom laboratóriu?
2. Kedy je vodovodná voda absolútne nepoužiteľná?
3. Aký je význam destilovanej vody v biologickom laboratóriu?
4. Ako sa zvyšuje kvalita destilovanej vody?
5. Kde sa využíva voda deionizovaná?
6. Na čo slúžia autoklávy pri deionizovanej vode?
7. Ako sa pripravuje deionizovaná voda?
8. Na čo slúžia filtre pri príprave vody špeciálnej kvality?
9. Čo je hlavným kritériom čistoty vody?

10. Ako skladujeme v biologickom laboratóriu destilovanú alebo deionizovanú vodu a prečo?

CHEMIKÁLIE A ICH UCHOVÁVANIE

Ako východiskové látky pre prácu v laboratóriu sa používajú väčšinou priemyselne vyrábané chemikálie. Chemikálie sú dodávané vo vhodnom obale, preto nie je nutné ich ďalej rozdeľovať do iných obalov. V prípade, že je to potrebné presunúť danú chemikáliu z dodávateľského balenia, používa sa vhodný obal a dodržia sa základné pravidlá skladovania chemikálií. Kvapalné látky sa uchovávajú vo fľašiach s dvojitém uzáverom. Hygroskopické látky sa chránia proti vzdušnej vlhkosti utesnením uzáveru napr. parafilmom. Hydroxidy a ich roztoky sa neskladujú v zábrusových fľašiach z toho dôvodu, že by došlo k ich vyzrážaniu na stenách zábrusu a nebolo by možné nádobu otvoriť. Látky citlivé na svetlo sa skladujú v tmavých nádobách a v tme. Skladovanie chemikálií v laboratóriu má svoj pevný poriadok, ktorý vychádza z bezpečnostných pravidiel, a preto vždy sa používaná chemikália vracia na pôvodné miesto. Dôraz je kladený predovšetkým na horľaviny a látky výbušné, ktoré nikdy nesmú byť uskladnené pohromade vo väčšom množstve. Jedy sa skladujú v špeciálnych železných, uzamykateľných skriniach. Pozor sa dáva tiež na uskladnenie prchavých látok v uzatvorených priestoroch (chladnička), ktoré sa skladujú tak, aby nedochádzalo k uvoľňovaniu ich pár.

Chemikálie sú označené od výrobcu štítkom udávajúcim základné informácie o danej chemikálii. Na takomto štítku je predovšetkým názov chemikálie, jej sumárny vzorec, množstvo, čistota a molekulová hmotnosť. Ďalej môžu byť uvedené niektoré dôležité fyzikálne vlastnosti a bezpečnostné informácie. Pri pevných látkach býva uvedená forma napr. kryštalická (*crystalisatum*), bezvodá (*anhydricum*), prášková (*pulveratum*). Podľa rastúcej čistoty (tzn. klesajúceho obsahu nečistôt) sa chemikálie delia na:

- I. technické chemikálie: surové (*crudum*), technické (*technicum*), čistené (*purum*) a
- II. čisté chemikálie: čisté (*purissimum*), pre analýzu (p.a., *per analysis*), chemicky čisté (*purissimum speciale*).

Chemikálie s vyššou čistotou sú označené priamo účelom, na ktorý by mali slúžiť, napr. pre UV spektrofotometriu, molekulárnu biológiu, HPLC analýzu atď. So zvyšovaním čistoty chemikálií však prudko rastie ich cena, preto chemikálie s vysokou čistotou používame len pre konkrétne špeciálne účely a len ak je to bezpodmienečne nutné.

Kontrolné otázky

1. Ako by ste charakterizovali pojem „chemikálie“?
2. Ako skladujeme chemikálie?
3. Ako sa uchovávajú kvapalné látky?
4. Na čo slúži parafilm?
5. Môžeme hydroxidy a ich roztoky skladovať vo fľašiach so zábrusom?
6. Ako skladujeme látky citlivé na svetlo?
7. Aké pravidlá platia pri skladovaní horľavín a výbušných látok?

8. Aké údaje obsahuje štítok na nádobe chemikálie?
9. Aké sú dva základné typy chemikálií podľa čistoty?
10. Na čo slúžia chemikálie s vyššou čistotou?

ZÁKLADNÉ OPERÁCIE V BIOLOGICKOM LABORATÓRIU

Meranie hmotnosti látok

Na stanovenie hmotnosti látok sa využívajú v chemickom laboratóriu **váhy**. Váženie je porovnávanie hmotnosti meraných pevných, prípadne kvapalných látok s hmotnosťou závažia. Princíp váženia je známy mnoho storočí – ide o porovnávaciu metódu, pri ktorej sa porovnáva neznáma hmotnosť určitého predmetu (navažovacia lodička, mikroskúmavka so vzorkou) so známou hmotnosťou štandardu (závažia). Mechanické zariadenia riešili toto porovnávanie pomocou docielenia rovnováhy na páke a mali tvar známych miskových váh. V minulosti najpresnejšie analytické váhy pracovali práve na tomto princípe a váženie zahŕňalo postupné pridávanie závaží rôznej veľkosti. Takýto postup bol samozrejme hlavne pre začiatočníkov veľmi zdĺhavý a zdrojom množstva chýb.

Existujú dva rozdielne typy váh líšiace sa váživosťou, tzn. maximálnou hmotnosťou váženia a presnosťou stanovenia hmotnosti váženého predmetu:

1. **Technické váhy** - majú podľa daného modelu váživosť od 100 g do niekoľkých kilogramov. Presnosť nebýva väčšia ako $5 \cdot 10^{-2}$ g.
2. **Analytické váhy** - majú váživosť obvykle do 100 g a presnosť rádovo 10^{-4} g.

Na orientačné zistenie hmotnosti predmetov, ktoré sa bude ďalej vážiť presnejšie, a na zisťovanie výťažkov čistiacich operácií sa používajú tzv. **predvážky**. Slúžia na váženie predmetov do 200 g s presnosťou na 0,1 g. V súčasnosti sa už používajú prevažne elektronické typy s digitálnym displejom, pričom stále prebieha ich neustály vývoj a je možné získať od jednoduchších, s mechanicko-elektronickým snímačom hmotnosti, cez váhy so snímačom merajúcim elektrický prúd, potrebný na vrátenie misky po zaťažení do nulovej polohy pomocou servomotoru, až k váham s tenzometrickým snímačom. Pre každé váhy je udané maximálne zaťaženie, ktoré sa nesmie prekročiť.

Pre každé váženie platí základné pravidlo: chemikálie (kvapalné ani pevné) nesmú prísť do priameho styku s miskami váh. Váhy chránime pred akýmkoľvek stykom s agresívnymi látkami. Všetky manipulácie s chemikáliami (pridávanie a uberanie) sa uskutočňujú mimo váh. Prípadné nečistoty na váhach je potrebné okamžite odstrániť štetcom, pričom v prostredí váh je nevyhnutné pracovať veľmi citlivo.

Vážime podľa nasledovného postupu:

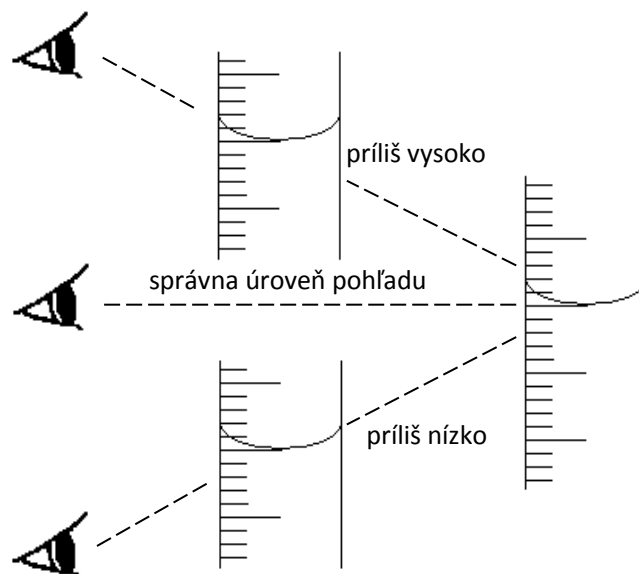
- I. Pred vážением skontrolujeme nulovú polohu váh.
- II. Vážený predmet kladieme do strednej časti misky váh.
- III. Váženú látku nekladieme nikdy priamo na miskú váh, ale použijeme odvažovačku, filtračný papier, hodinové sklíčko a podobne.
- IV. Na miskú váh nekladieme nečisté, mokré alebo horúce predmety. Horúce predmety vychladíme pred vážением v exsikátore.
- V. Po skončení váženia nastavíme nulovú polohu váh.

VI. Váhy udržiavame vždy v maximálnej čistote.

Meranie objemu kvapalín

Na odmeriavanie objemov kvapalín slúžia odmerné valce, pipety, byrety, pyknometre a odmerné banky.

Odmerné valce sa používajú len na približné odmeriavanie kvapalín. Na presnejšie meranie objemov sa používajú **pipety** (buď pre konkrétny objem alebo delené) a **byrety**, pri ktorých je možné kohútom alebo pomocou tlačky regulovať vytekanie kvapaliny. Pri plnení pipiet je treba vždy dbať na to, aby ústie pipety bolo stále ponorené pod hladinou kvapaliny. Pri jeho vynorení nad hladinu dochádza k nasatiu vzduchu do pipety, čo môže spôsobiť i vniknutie pipetovanej kvapaliny do úst pipetujúceho, prípadne do podtlakového zariadenia (zvyčajne gumeného balónika). Po nasatí kvapaliny do pipety nad rysku označujúcu požadovaný objem sa uzatvorí horný koniec pipety ukazovákom – nie palcom. Opatrným uvoľňovaním prstu po kvapkách sa vypúšťa kvapalina. Pri odčítaní je nutné mať oko v rovnakej úrovni so značkou. Odčítava sa vždy spodný okraj menisku (Obrázok 9).



Obrázok 9: Odčítanie menisku pri pipetovaní.

Jedovaté kvapaliny a koncentrované kyseliny a zásady sa nenasávajú nikdy do pipety ústami, ale používajú sa špeciálne násadky či gumové balóniky. Keďže je pipeta kalibrovaná na vyliatie, nikdy sa nevyfukuje, ale jej obsah sa nechá iba voľne vytečiť a jej špička sa otrie o dno alebo stenu nádoby, do ktorej sa kvapalina pipetuje.

V súčasnej dobe sa v biochemickom alebo molekulárno-biologickom laboratóriu pracuje so sklenenými pipetami minimálne, prakticky úplne ich nahradili automatické pipety umožňujúce presnejšie a pohodlnejšie odmeranie daného objemu (Obrázok 10).

Sú vhodné i pre pipetovanie mikrolitrových objemov. Automatické pipety sú vyrábané pre rôzne rozsahy objemov (1 - 10 ml, 1 – 5 ml, 100 – 1000 μ l, 20 – 200 μ l, 2 – 20 μ l a 0,2 – 2 μ l). Objem sa nastavuje otočením skrutky na stupnici a nasatie kvapaliny sa realizujú pohybom piestu automatickej pipety, čím sa vytvára nevyhnutný podtlak. Na rozdiel od sklenených pipiet pri pipetovaní automatickými pipetami je nevyhnutné používať plastové špičky s odpovedajúcim rozmerom a pipetovanou kapacitou. Pipetovaním roztoku bez použitia pipetovacích špičiek by mohlo dôjsť rýchlo k poškodeniu automatickej pipety aj v prípade vodných roztokov solí.



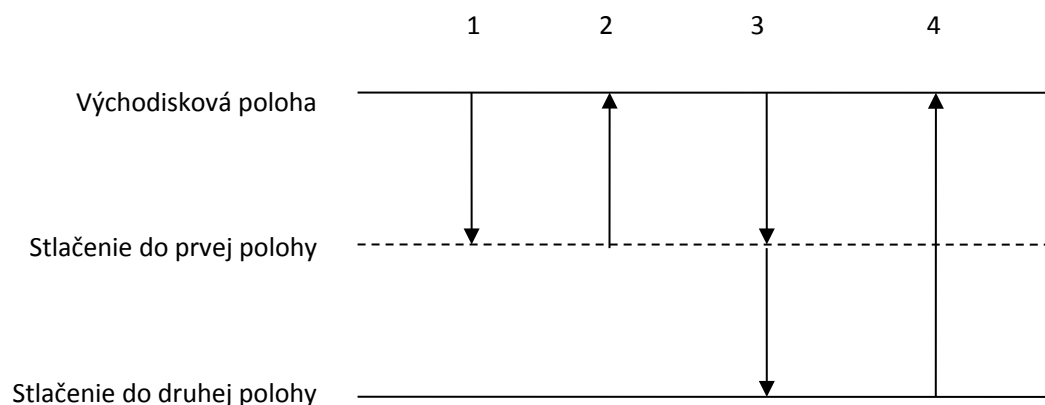
Obrázok 10: Automatické multikanálové a jednokanálové pipety.

Pipety sa rozlišujú podľa prevedenia na jednokanálové alebo multikanálové. Jednokanálové pipety sú určené na pipetovanie vybraného objemu jedného roztoku, zatiaľ čo multikanálové pipety, ktoré najčastejšie konštruované ako osem- alebo dvanásťkanálové, sú určené pre súčasné pipetovanie rovnakého objemu viacerých roztokov paralelne, zvyčajne do mikrotitračnej platničky. Každý kanál má svoj vlastný piest, preto nie je nutné používať všetky kanály, teda je možné nasadiť aj menej ako osem alebo dvanásť špičiek.

Nasávanie a vypúšťanie kvapaliny cez nasaditeľnú špičku je ovládané piestom, ktorý má tri polohy – kľudovú, pre nasávanie a pre vypúšťanie. Najčastejšie používanou technikou pipetovania je priame pipetovanie. Pri priamom pipetovaní sa do špičky nasaje presne stanovený objem a v ďalšom kroku sa zo špičky vytlačí tento objem do pripravenej nádoby. Postup pipetovania je znázornený na Obrázku 11.

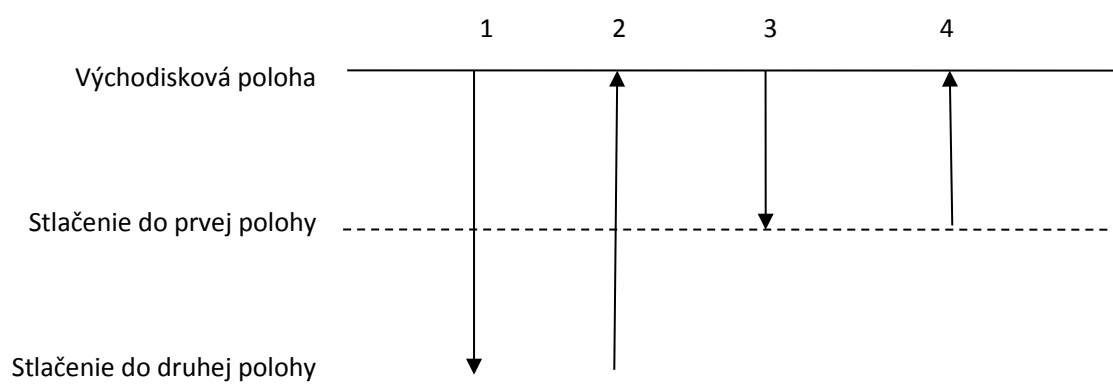
Pri pipetovaní malých objemov (do 50 μ l) sa využíva zásadne reverzný mód pipetovania. Jedna kvapka predstavuje približne 33 μ l, preto ani s najlepšou pipetou nie je možné vytlačiť

z pipetovacej špičky úplne všetku tekutinu, ktorej je menej ako jedna kvapka. Čím menší je pipetovaný objem, tým väčšia je relatívna chyba, ktorej sa dopustíte pri priamom (nereverznom) pipetovaní.



Obrázok 11: Polohy automatickej pipety pri nasávaní a vypúšťaní kvapaliny pri priamom pipetovaní. 1 – stlačenie piestu pipety do prvej polohy, 2 – nasatie daného objemu do špičky za postupného pomalého (!) uvoľňovania piestu, 3 – vytlačenie objemu zo špičky do reakčnej zmesi stlačením piestu do druhej polohy a 4 – vrátenie piestu automatickej pipety do kľudovej polohy pomalým uvoľnením piestu.

Pri reverznom pipetovaní sa stláča piest pipety pri nasávaní tekutiny do druhej polohy a pri jej vytlačení po prvú polohu. Takže po napipetovaní ostáva v pipetovacej špičke zvyšný objem tekutiny (Obrázok 12). Elektronické pipety umožňujú tiež tento spôsob pipetovania. Relatívna chyba je pri reverznom spôsobe pipetovania výrazne menšia.



Obrázok 12: Polohy automatickej pipety pri nasávaní a vypúšťaní kvapaliny pri reverznom móde pipetovania. 1 – stlačenie piestu pipety do druhej polohy, 2 – nasatie daného objemu do špičky za postupného pomalého (!) uvoľňovania piestu do kľudovej polohy, 3 – vytlačenie objemu zo špičky do reakčnej zmesi stlačením do prvej polohy piestu a následne vytlačenie zvyšku kvapaliny do zásobnej fľaše alebo odpadu a 4 – vrátenie automatickej pipety do kľudovej polohy pomalým uvoľnením piestu.

Pri pipetovaní pomocou automatických pipiet je potrebné si uvedomiť, že nasávanie pipetovanej kvapaliny je spôsobené vytvorením podtlaku pohybom piestu v pipete, čo znamená, že v prípade nižšie vrúcich, prchavých kvapalín (éter, chloroform, acetón a pod.) pri laboratórnej teplote alebo vyššie vrúcich kvapalín s vyššou ako laboratórnou teplotou (etanol, voda a pod.) je potrebné prispôbiť postup pipetovania tak, aby nedošlo k stratám pipetovanej kvapaliny vplyvom zníženia podtlaku prchajúcimi parami daného rozpúšťadla.

Byrety slúžiace k regulovanému odberu kvapalín pri titráciách sú sklenené trubice označené objemovou stupnicou. Pred výtokom je umiestnený kohút alebo pružná hadička s tlačkou. Niektoré byrety majú pre lepšie odčítavanie objemu zadnú stenu z bieleho skla s modrým pruhom v strede.

Odmerné banky, podobne ako pyknometre (nádoby na stanovenie hustoty), sú kalibrované na naliatie. Hrdlo odmerných baniek je pomerne úzke, po celom obvode s ryskou. I tu je potrebné naplňať banku tak, aby sa spodný okraj menisku dotýkal rysky a pri plnení je potrebné mať oko na úrovni rysky. Podobne ako odmerné valce i odmerné banky sa vyrábajú v objemoch od 5 ml do 2 l. Odmerné banky sa používajú na prípravu roztokov s presnou koncentráciou. Vlastné zmiešavanie zložiek roztoku sa uskutočňuje pri nie celkom zaplnenej banke a až po úplnej homogenizácii zmesi (rozpuštení a rovnomernom rozptýlení rozpúšťaných zložiek) a vyrovnaní teplôt (teplota, na ktorú je banka kalibrovaná, je uvádzaná na plášti banky – väčšinou 20 °C) opatrne sa dopĺňa rozpúšťadlom po rysku.

Chromatografické metódy

Chromatografia patrí medzi fyzikálno-chemické metódy určené na separáciu látok, pričom separované látky sú distribuované medzi dve fázy, z ktorých jedna je nepohyblivá (stacionárna) a druhá sa pohybuje v definovanom smere (pohyblivá, mobilná).

Každý chromatografický systém sa skladá z troch základných prvkov:

- I. nepohyblivá (stacionárna) fáza - jednotlivé zložky z analyzovanej zmesi sú pútané fyzikálnymi a/alebo chemickými silami,
- II. pohyblivá (mobilná) fáza – pohybuje jednotlivými zložkami separovanej vzorky stacionárnou fázou a
- III. samotné zložky analyzovanej vzorky.

Podľa skupenstva pohyblivej fázy sa chromatografia rozdeľuje na plynovú chromatografiu a kvapalinovú. Podľa usporiadania chromatografického systému chromatografiu delíme na kolónovú a tenkovrstvovú.

Pri tenkovrstvovej chromatografii (TLC, z anglického Thin-Layer Chromatography) prebieha delenie zložiek zmesi látok v tenkej vrstve pevnej, stacionárnej fázy (sorbentu) pomocou kvapalnej, mobilnej fázy. Používané sorbenty sú silikagél, oxid hlinitý, celulóza, polyamid a i. Počas vyvíjania putuje mobilná fáza vzostupne kapilárnymi silami medzi časticami sorbentu a unáša delené látky pozdĺž deliacej vrstvy. V priebehu delenia sa neustále obnovuje rovnováha medzi pohyblivou a nepohyblivou fázou. Za rovnakých

podmienok má určitá látka na chromatograme stále miesto (R). Retardačný faktor (Rf) je pomer vzdialenosti unášanaj látky od štartu ku vzdialenosti čela rozpúšťadla od štartu. Vždy je to hodnota menšia ako 1.

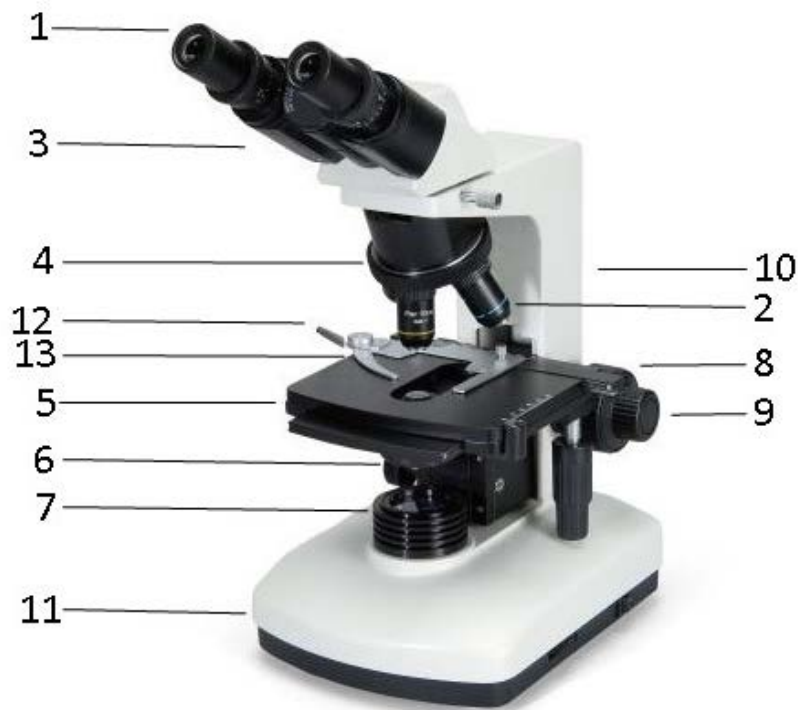
Kontrolné otázky

1. Ako sa rozdeľujú váhy líšiace sa váživosťou?
2. Na čo slúžia predvážky?
3. Uveďte rozdiel medzi odmerným valcom a odmernom bankou.
4. Na čo slúžia byrety?
5. Na čo slúžia automatické pipety?
6. Aký mód by ste použili pri pipetovaní 27 μ l roztoku? Vysvetlite.
7. Na čo slúžia v laboratóriu odmerné banky?
8. Ako by ste charakterizovali chromatografiu?
9. Ktoré tri základné prvky tvoria chromatografický systém?
10. Ako by ste vypočítali retardačný faktor pri chromatografii?

ZÁKLADY MIKROSKOPOVANIA

Mikroskopovaním rozumieme pozorovanie objektov mikroskopom. Mikroskop je optický prístroj, ktorý slúži na zväčšené zobrazenie malých objektov. Pod označením mikroskop sa obvykle myslí optický mikroskop, ktorý na zobrazenie používa svetelné lúče. Existujú však aj mikroskopy využívajúce iné princípy a spôsoby zobrazenia, napr. elektrónový mikroskop alebo polarizačný mikroskop. Skúmaná vzorka musí byť tenká a takmer „priesvitná“, aby ju mohol prúdiť svetelných lúčov presvietiť. Na dosiahnutie väčšej jasnosti je občas potrebné vzorku zafarbiť.

Mikroskop sa skladá z troch základných častí: z **mechanickej** (statív, tubus a stolík), **optickej** (okulár a objektív) a **zdroja svetla** (zrkadlo, kondenzor a svetelný zdroj) (Obrázok 13).



Obrázok 13: Stavba svetelného binokulárneho mikroskopu. 1 – okulár, 2 – objektív, 3 – tubus, 4 – revolverový menič objektívov, 5 – stolček mikroskopu, 6 – kondenzor s irisovou clonou, 7 – svetelný zdroj, 8 – makrometrická skrutka, 9 – mikrometrická skrutka, 10 – nosič stolčeka a tubusu, 11 – noha, 12 – svorky na prichytenie preparátu, 13 – skrutky na ovládanie priečného a pozdĺžneho posunu preparátu na stolčeku mikroskopu (krížový vodič preparátu).

Preparát kladieme na stolček mikroskopu, ktorý má uprostred otvor. Preparát prichytíme dvomi kovovými svorkami, s ktorými je prepojený krížový vodič preparátu. Ten umožňuje pohybovať stolčekom a na ňom umiestneným preparátom vždy len jedným z dvoch na seba kolmých smerov. Pri samotnom mikroskopovaní zaostrujeme pohybom stolčeka dvomi skrutkami postupným vzdďalovaním preparátu od objektívu, pričom

makrometrická skrutka je zodpovedná za hrubé zaostrenie a „vyhľadanie“ obrazu a mikrometrická je zodpovedná za jemné doostrovanie obrazu.

Stupeň zväčšenia a kvalita obrazu závisí od vlastností objektívu. Objektív predstavuje systém šošoviek, ktorý vytvára reálny a zväčšený obraz pozorovaného predmetu. Objektív musí byť bez chýb a je zložený z viacerých jednoduchých šošoviek, ktoré sú zasadené do kovových objímok a sú presne centrované, t.j. majú spoločnú optickú os. Na objektívoch sa okrem výrobného čísla nachádzajú ešte ďalšie dve čísla: väčšie označujúce zväčšenie objektívu (označované pomocou „x“, napr. 10x, 40x) a vedľa neho alebo pod ním menšie číslo uvádzajúce jeho numerickú apertúru A (bezrozmerné číslo vyjadrujúce v mikroskopii účinnú svetelnosť objektívu, pričom najkvalitnejšie objektívy majú numerickú apertúru 1,3 - 1,4). S numerickou apertúrou súvisí rozlišovacia schopnosť. Schopnosť objektívu rozlíšiť štrukturálne detaily objektu, tzn. vzdialenosť dvoch bodov v objekte (ak by boli bližšie k sebe, splynuli by do jedného bodu), ktoré ešte oddelene odlíšime, je tým väčšia, čím väčšia je numerická apertúra objektívu.

Mikroskop postavíme nosičom tubusu k sebe. Zvolíme vhodný okulár a najmenej zväčšujúci objektív. Zorné pole osvetlíme zdrojom svetla (v našom prípade lampou), aby sme dosiahli rovnomerné osvetlenie. Preparát upevníme svorkami na stolíku a orientujeme ho tak, aby sa pozorovaná časť preparátu nachádzala nad kruhovým výrezom stolíka, v optickej osi mikroskopu. Pomocou makrometrickej skrutky zdvihneme stolček s preparátom na takú úroveň, aby sa bezprostredne priblížil k použitému objektívu. Následne obraz vyhľadáme a hrubo zaostříme pomocou makrometrickej skrutky vzdáľovaním preparátu od objektívu, pričom obraz objektu pozorujeme cez okulár. Pohybovať musíme veľmi jemne, pretože rýchlym pohybom môžeme obraz objektu stratiť. Nikdy nepohybujeme makrometrickou skrutkou opačným smerom (zdvíhanie stolčeka mikroskopu) za súčasného pozorovania obrazu v okulári, pretože pri prílišnom priblížení objektívu k preparátu by sme mohli poškodiť šošovku objektívu alebo rozbiť preparát. Preto, ak je potrebné preparát opäť priblížiť k objektívu, posun stolčeka s preparátom makrometrickou skrutkou pozorujeme zo strany. Vzdialenosť medzi preparátom a objektívnom vhodná na pozorovanie mikroskopických objektov závisí od zvoleného objektívu, pričom sa pohybuje od niekoľkých centimetrov pri objektívoch s nižším zväčšením až po 0,2 mm v prípade objektívov s vysokým zväčšením. Po objavení objektu v mikroskope zaostřujeme jemne pomocou mikrometrickej skrutky, pričom tou pohybujeme jemne hore i dolu. Pri zaostrovaní pracujeme aj so zdrojom svetla a irisovou clonou. Vo všeobecnosti platí, že čím je zväčšenie väčšie, tým viac približujeme kondenzor k objektu a sťahujeme clonu.

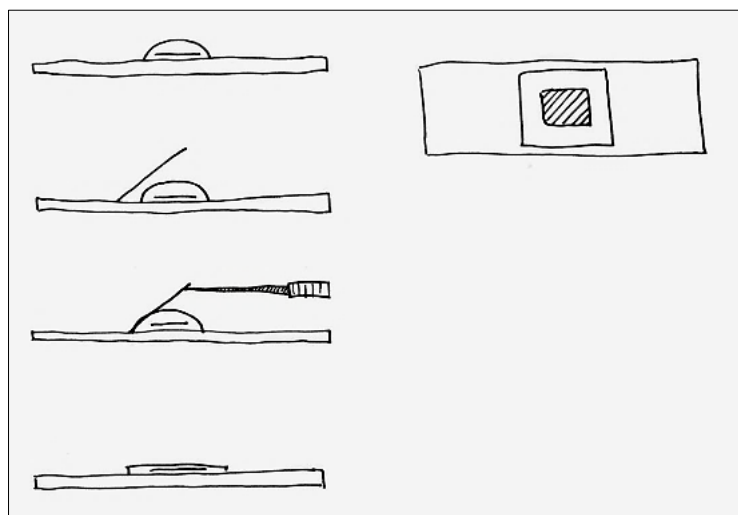
Každý preparát prehladame najskôr pri malom zväčšení a až keď sa v ňom vieme orientovať, nastavíme väčšie zväčšenie. Miesto na preparáte, ktoré chceme detailnejšie pozorovať, nastavíme do stredu zorného poľa, aby sa nám pri silnejšom zaostrení nestratilo (v obraze sa zväčší detail, ale zúži sa zorné pole). Pri posúvaní preparátu na stolčeku krížovými vodičmi musíme mať na pamäti, že obraz v mikroskope sa pohybuje opačným smerom ako preparát. Neostrý, matný alebo škvrnitý obraz môže vzniknúť z viacerých dôvodov:

- i.) zlé osvetlenie zorného poľa,
- ii.) znečistenie optiky mikroskopu alebo sklíčok s preparátom,
- iii.) zložité zaostrenie obrazu pri väčšom zväčšení.

Aby sme sa vyhli chybám, vždy pred mikroskopovaním skontrolujeme všetky dôležité súčasti mikroskopu, či sú funkčné a čisté. Preparát tiež udržiavame čistý a nechytáme ho zbytočne rukami, aby sme nezanechali na ňom otláčky prstov.

Zhotoveniu preparátov venujeme dostatočnú pozornosť, pretože mikroskop nezväčšuje iba pozorovaný objekt, ale aj jeho nedostatky. Mikroskopický preparát sa skladá z podložného a krycieho sklíčka, objektu a prostredia, v ktorom je objekt uložený. Podložné sklíčka sú zvyčajne hrubšie (0,5 až 1,5 mm) a väčšie (76 x 26 mm). Krycie sklíčka majú rôzne veľkosti a podľa hrúbky sa označujú číslami 0, 1 a 2. Pred zhotovením preparátu sklíčka dobre odmastíme a vyčistíme opláchnutím v destilovanej vode a vysušíme suchou, čistou handričkou. Vždy obe sklíčka držíme za hranu, aby sme ich otláčkami prstov neznečistili. Okrem sklíčok potrebujeme preparačnú ihlu, pinzetu, skalpel alebo nožničky, misku s vodou, pipetu alebo kvapkadlo a prúžky filtračného papiera.

Najčastejšie pripravujeme dočasné preparáty, určené pre okamžitú prácu. Do stredu podložného sklíčka preniesieme pipetou alebo kvapkadlom kvapku destilovanej vody alebo iný vhodný roztok. Pinzetou alebo preparačnou ihlou umiestnime do kvapky vody objekt, ktorý je dostatočne tenký, aby mohol byť celý presvietený zdrojom svetla mikroskopu. Objekt prikryjeme čistým, krycím sklíčkom tak, že ho položíme najskôr šikmo na hranu a potom pozvoľna spúšťame na objekt tak, aby mohol unikať vzduch a nevznikli bubliny (Obrázok 14).



Obrázok 14: Príprava preparátu.

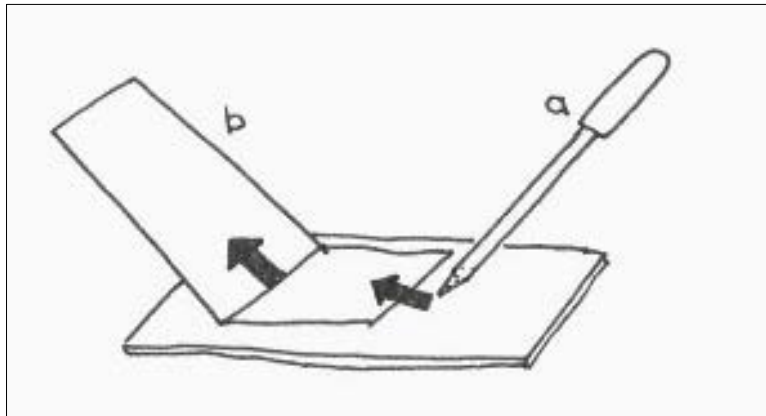
Preparát je správne pripravený, ak spĺňa nasledovné podmienky:

1. Voda musí vyplniť celý priestor medzi podložným a krycím sklíčkom, ale nesmie prejsť na vrchnú stranu krycieho sklíčka. Ak sa tak stane, pripravíme nový preparát. Ak je pod

krycím sklíčkom veľa vody, prúžkom filtračného papiera môžeme nadbytok odsáť. Ak pod krycím sklíčkom je málo vody alebo sa vytvorila vzduchová bublina, priblížime sa opatrne s kvapkadlom k okraju krycieho sklíčka, pri ktorom už voda je, a vodu opatrne doplníme.

2. Pozorovaný objekt je vždy menší ako krycie sklíčko a musí ležať v strede preparátu.

Ak prostredie, v ktorom je objekt pozorovania umiestnený, chceme nahradiť iným, urobíte to tzv. **presávacou metódou** (Obrázok 15). K jednému okraju krycieho sklíčka prikvapneme nový roztok (napr. Lugolov alebo roztok kyseliny, príp. zásady) a k protiľahlému okraju priložíme prúžok filtračného papiera tak, aby nasával pôvodné médium. Po krátkom čase nastane úplná výmena roztoku pod krycím sklíčkom.



Obrázok 15: Postup pri presávacej metóde. a – kvapkadlo, b – filtračný papier

Mikroskopické objekty, ktoré vidíme v zornom poli mikroskopu, obyčajne zakresľujeme alebo odfoťíme do protokolu. Kreslenie je dôležité a pri prekresľovaní si objekt zároveň detailne prezeráme. Prekresľujeme objekt čo naj dôveryhodnejšie pri zachovaní farieb, štruktúr a veľkosti. Pri popise obrázku vždy zapíšeme aj zväčšenie a numerickú apertúru objektívu.

Cvičenie č. 1: Základy mikroskopovania, pozorovanie tlačeneho písma

Objekt: písmo rôznej veľkosti tlačené na papieri.

Pomôcky: svetelný, binokulárny mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, pinzeta, preparačné ihly, skalpel.

Postup 1: Mikroskop postavíme na stôl a postupne sa oboznámime so všetkými jeho časťami a ich obsluhou. Bez preparátu na stolčeku skúšame činnosť makro- a mikro-metrickej skrutky, prácu so zdrojom svetla, stolčekom a irisovou clonou.

Postup 2: Na podložné sklíčko si položíme kúsok papiera s predtlačenými písmami. Podložné sklíčko upevníme pomocou skrutiek na stolčeku mikroskopu. Pozorujeme pri malom

zväčšením (objektív 10x). Pri väčšom zväčšení (40x, 100x) pozorujeme detailnú štruktúru papiera.

Doba trvania cvičenia: 20 min.

Výsledok: **1.** Oboznámime sa s činnosťou mechanických a optických častí svetelného mikroskopu. Vyskúšame si opatrne manipuláciu s jednotlivými časťami mikroskopu a samotné mikroskopovanie. **2.** Pozorujeme pod mikroskopom obraz; zakreslíme, čo pozorujeme a podrobne zapíšeme postup, ako sme mikroskopovali a aký objekt pri akom zväčšení sme pozorovali.

Cvičenie č. 2: Pozorovanie trvalého preparátu

Objekt: trvalé preparáty rastlinného, živočíšneho i ľudského pôvodu.

Pomôcky: svetelný, binokulárny mikroskop, trvalé preparáty.

Postup: Trvalý preparát vložíme do svetelného mikroskopu na stolček a pozorujeme pri rôznych zväčšeniach, pričom začíname vždy od najmenšieho zväčšenia. Pohybujeme stolčekom a pozorujeme trvalý preparát na rôznych miestach.

Doba trvania: 15 min.

Výsledok: Hrubým a následne jemným zaostrovaním pomocou makrometrickej a mikrometrickej skrutky pozorujeme trvalý preparát najskôr pri malom a neskôr pri väčšom zväčšení. Snažíme sa zaostriť tak, aby sme preparát videli jasne a zreteľne. Pozorne zakreslíme, príp. odfoťíme sledovaný objekt a zapíšeme, aký objekt sme použili a pri akom zväčšení sme preparát pozorovali.

Cvičenie č. 3: Príprava a pozorovanie natívneho mikroskopického preparátu

Objekt: cibuľa kuchynská (*Allium cepa* L.).

Pomôcky: mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, pinzeta, preparačné ihly, skalpel, kvapkadlo.

Postup: Pripravíme si mikroskop na mikroskopovanie. Podložné aj krycie sklíčko očistíme suchou handričkou alebo papierovou utierkou. Na podložné sklíčko kvapneme kvapkadlom kvapku vody. Z prekrojenej cibule pinzetou stiahneme jednu vrstvu. Z tejto vrstvy odrežeme dostatočne veľký preparát, ktorý sa dá zakryť vyčisteným krycím sklíčkom. Preparát pomocou pinzety položíme do kvapky vody na podložnom sklíčku. Preparát prekryjeme krycím sklíčkom tak, že ho postupne spúšťame z boku, aby sa nevytvorili vzduchové bublinky. Pod celým krycím sklíčkom musí byť voda. Ak jej je málo, dokvapneme ju pomocou kvapkadla k okraju krycieho sklíčka, kde voda je. Ak je vody veľa, odsajeme prebytočnú kúskom filtračného papiera. Preparát umiestnime do mikroskopu a pozorujeme pri rôznych zväčšeniach.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Preparát pozorujeme najskôr pri menšom zväčšení (10x), kedy sledujeme štruktúru pletiva cibule a následne pri vyššom zväčšení (40x až 100x) pozorujeme štruktúru jednotlivých buniek. Správne zaostrujeme najskôr makro- a následne i mikrometrickou skrutkou, aby sme jednotlivé štruktúry videli jasne a zreteľne, ostro. Zakreslíme pozorované objekty, snažíme sa ich pomenovať a zapíšeme, pri akom zväčšení sme objekt pozorovali.

Cvičenie č. 4: Pozorovanie objektu v rôznych optických hladinách

Teoretický úvod: V prípade pozorovania trojrozmerného objektu (napr. ľudský vlas, riasa) potrebujeme realizovať jeho pozorovanie v rôznych optických hladinách, obzvlášť pri väčších zväčšeniach. Pri pozorovaní malým zväčšením vidíme celý objekt ostrý. Hĺbka ostrosti tohto objektu je veľká. Pri použití silnejšieho objektívu je ostrá len tá vrstva objektu, na ktorú práve zaostríme. Trojrozmerný objekt (napr. ľudský vlas) je valcovité teleso s viacerými rovinami, pričom hovoríme o optických rovinách. Pri mikroskopovaní otáčame (zaostrujeme) stále mikroskrotkou a tak si postupne vytvárame priestorovú predstavu o pozorovanom objekte.

Objekt: ľudský vlas.

Pomôcky: mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, pinzeta, preparačné ihly, skalpel, kvapkadlo.

Postup: Do kvapky vody na očistenom podložnom sklíčku vložíme ľudský vlas s vlasovou cibulkou. Objekt pozorujeme pri rôznych zväčšeniach.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Pod mikroskopom pozorujeme objekt najskôr pri menšom zväčšení a postupne pri väčšom zväčšení pozorujeme detailnejšiu štruktúru objektu. Správne zaostrujeme makro- a postupne i mikrometrickou skrutkou, aby sme objekt videli zreteľne, s ostrými obrysami. Pozorovaný objekt zakreslíme alebo odfotíme a zapíšeme, čo predstavuje a pri akom zväčšení sme ho pozorovali.

Cvičenie č. 5: Pozorovanie štruktúr rastlinného objektu

Objekt: stielka zelených rias alebo rastlina prhľavy dvojdomej (*Urtica dioica* L.).

Pomôcky: svetelný mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, pinzeta, preparačné ihly, skalpel, kvapkadlo.

Postup: Podložné aj krycie sklíčko očistíme handričkou. Pripravíme si natívny preparát vlákna zelenej riasy v kvapke destilovanej vody. V prípade použitia rastliny prhľavy dvojdomej si do kvapky vody na podložnom sklíčku umiestnime časť čepele listu alebo tenký pozdĺžny rez stonky. Preparát umiestnime do mikroskopu a pozorujeme pri rôznych zväčšeniach rôzne časti preparátu. Zakreslíme alebo odfotíme a popíšeme jednotlivé pozorované štruktúry.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Zakreslíme a zapíšeme pozorovaný objekt najskôr pri malom zväčšení (10x) a postupne pri väčšom zväčšení. Hlavne pri väčšom zväčšení (40x a viac) zakreslíme a popíšeme jednotlivé pozorované štruktúry v rámci rastlinnej bunky.

Cvičenie č. 6: Pozorovanie štruktúr živočíšneho objektu

Objekt: živočíšny organizmus ako napr. „vínna muška“ (*Drosophila melanogaster* L.) alebo mucha domáca (*Musca domestica* L.), prípadne pavúk alebo motýľ.

Pomôcky: svetelný mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, pinzeta, preparačné ihly, skalpel, kvapkadlo.

Postup: Podložné aj krycie sklíčko očistíme handričkou. Pripravíme si natívny preparát časti organizmu živočíšneho objektu (napr. krídlo, noha, hlava) v kvapke destilovanej vody. Preparát umiestnime do mikroskopu a pozorujeme pri rôznych zväčšeniach. Zakreslíme alebo odfoťme a popíšeme jednotlivé pozorované štruktúry.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Pri malom zväčšení (10x) pozorujeme tvar orgánu a jeho základnú štruktúru v detailoch a čiastočne aj jednotlivé bunky, ktoré tvoria tkanivo pozorovaného objektu. Pri zväčšení 40x a správnom zaostrení jasne vidíme štruktúru buniek. Dôležité je však používať pri tomto zaostrení mikrometrickú skrutku. Pri zväčšení 100x vidíme detailnú štruktúru živočíšnych tkanív. Pozorované objekty zakreslíme alebo odfoťme a zapíšeme pozorované štruktúry pri jednotlivých zväčšeniach.

Cvičenie č. 7: Pozorovanie prvkov

Objekt: voda z kaluže, prípadne prírodnej vodnej nádrže obsahujúca jednobunkové eukaryotické organizmy z taxónu nálevníky (*Ciliophora*).

Pomôcky: svetelný mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, pinzeta, preparačné ihly, kvapkadlo.

Postup: Podložné aj krycie sklíčko očistíme handričkou. Do stredu podložného sklíčka kvapneme jednu kvapku experimentálnej vody. Opatrne na kvapku položíme očistené krycie sklíčko a preparát umiestnime do mikroskopu. Pozorujeme pri rôznych zväčšeniach, pričom začíname najmenším zväčšením. Zakreslíme alebo odfoťme a popíšeme jednotlivé organizmy a jeho štruktúry, ktoré pozorujeme.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Pri malom zväčšení (10x) pozorujeme tvar jednobunkových eukaryotických organizmov a ich základnú štruktúru. Pri zväčšení 40x a viac a pri správnom zaostrení jasne vidíme štruktúry vo vnútri bunky a pozorujeme jednotlivé bunkové organely. Pri zväčšení 100x vidíme detailnú štruktúru povrchu tela jednobunkového organizmu a detailnú stavbu jednotlivých organel. Pozorované štruktúry zakreslíme alebo odfoťme a popíšeme pri jednotlivých zväčšeniach.

1. Na čo slúži mikroskop?
2. Z akých troch základných častí sa skladá svetelný mikroskop a na čo sú jednotlivé časti určené?
3. Na čo slúži makrometrická a na čo mikrometrická skrutka?
4. Popíšte princíp sledovania predmetu cez optický mikroskop.
5. Na čo slúži presávacia metóda?
6. Popíšte, ako by ste uskutočnili presávaciú metódu.
7. V akej forme vidíme obraz pod mikroskopom?
8. Aké dve podmienky musí spĺňať preparát, aby bol správne pripravený?
9. Popíšte krátko podložné a krycie sklíčko.
10. Vymenujte aspoň dve chyby spôsobujúce, že preparát je neostrý a matný.

Zaujímavosť

Rimania používali zväčšovacie sklá už pred 2000 rokmi. Prvý mikroskop bol zostrojený okolo roku 1590 holandskými výrobcami monoklov (sklenených šošoviek) bratmi Hansom a Zacharisom Janssenovcami. Neskôr sa touto prvou konštrukciou mikroskopu zaoberal a vylepšoval ju napr. Galileo Galilei (1610). V roku 1663 anglický bádateľ a geológ Robert Hooke skúmal pod mikroskopom hmyz a rastliny. Zistil, že korok sa skladá z malých buniek, čo bol vedecky veľmi významný objav. Vo svojom diele *Micrographia* popísal konštrukciu mikroskopu s oddeleným objektívom, okulárom a osvetľovacím zariadením. Práce Antona van Leeuwenhoeka patrili k vrcholom mikroskopického pozorovania v období 17. storočia. Mikroskopy rýchlo vzbudili záujem o malé živé organizmy. Približne po roku 1980 boli skonštruované aj iné typy snímacích mikroskopov. Elektrónový mikroskop zobrazuje povrch alebo vnútornú štruktúru pomocou elektrónov. Na zobrazenie používa viditeľné svetlo vo forme fotónov. Prúd elektrónov v tomto mikroskope je usmernený a zaostrý na zobrazovaný objekt sústavou elektrostatických a elektromagnetických „šošoviek“. Elektrónovými mikroskopmi sa skúmajú anorganické i organické vzorky, sú schopné identifikovať napríklad atómy, merať fyzikálno-chemické i elektrické vlastnosti materiálov. Neumožňujú však sledovať procesy v živých bunkách. Polarizačný mikroskop sa riadi Biotovými zákonmi súvisiacimi s rotačnou polarizáciou a používa sa hlavne v mineralógii. Fluorescenčný mikroskop je založený na princípe, že niektoré látky po absorpcii UV žiarenia vysielať žiarenie väčšej vlnovej dĺžky. Pri tomto type mikroskopu sa využíva napríklad fluoreskujúca vlastnosť farbív viazaných na skúmané štruktúry buniek. Slúži na pozorovanie špecifických štruktúr v rámci rastlinných i živočíšnych buniek. Tento typ mikroskopie ako prvý umožnil vizualizovať štruktúry cytoskeletu eukaryotických buniek, využíva sa v imunohistológii, imunocytológii a imunocytochémií. V bunkovej biológii sa využíva na identifikáciu zložiek cytoskeletu, bunkových organel a k sledovaniu biochemických procesov. V mikrobiológii sa využíva k identifikácii rôznych bakteriálnych rodov.

Renomovanou značkou v mikroskopii a laboratórnej optike je už od roku 1846 značka Carl Zeiss. Jej zakladateľom bol nemecký optik a jemný mechanik Carl Zeiss. Carl Zeiss sa narodil

11. septembra 1816 v nemeckom meste Weimar ako piate z dvanástich detí dvorného sústružníckeho majstra, po ktorom zdedil cit k remeslu. S odhodlaním stať sa mechanikom nastúpil ako osemnásťročný na univerzitu v Jene, kde navštevoval rôzne prednášky, najmä matematiku, fyziku a mineralógiu. Budúci priekopník rozvoja mikroskopu v 19. storočí si uvedomoval, že na lepšiu konštrukciu optických šošoviek je potrebný aj teoretický základ. Značka Carl Zeiss sa stala symbolom priekopníctva a najvyššej kvality. Ich mikroskopy pri svojich objavoch využili napríklad svetoznámi vedci Louis Pasteur či Robert Koch.

SACHARIDY

Živá hmota (bioplazma) nie je z hľadiska chemického zloženia jednotná, ale skladá sa z mnohých látok, ktoré sa vyskytujú vo forme prvkov a zlúčenín. Bioplazma sa vyznačuje určitým stupňom organizácie a prebiehajú v nej rôzne biochemické procesy. Bioplazma obsahuje asi 60 prvkov z Mendelejevovej periodickej sústavy. Všetky prvky podieľajúce sa na stavbe látok živej prírody sa nazývajú biogénne prvky. Z hľadiska **organických látok** sú v bunke najviac zastúpené: sacharidy, proteíny, tuky, nukleové kyseliny. Tieto zložky živých organizmov nazývame primárne metabolity.

Sacharid alebo glycid je spoločný názov pre skupinu opticky aktívnych polyhydroxyderivátov karbonylových zlúčenín, ktoré sa nachádzajú vo všetkých živých organizmoch a vírusoch. Sacharidy sú organické zlúčeniny zložené z uhlíka (C), vodíka (H) a kyslíka (O). Ich deriváty môžu obsahovať aj fosfor (P), dusík (N) alebo síru (S).

Hlavné funkcie sacharidov sú nasledovné: i) zdroj energie (väčšina sacharidov, predovšetkým glukóza), ii) štruktúrna (stavebná) funkcia (hlavne celulóza pri rastlinách a chitín pri živočíchoch), iii) zásobná funkcia (v rastlinách škrob, v hubách a živočíchoch glykogén), iv) súčasť biologicky aktívnych molekúl ako sú enzýmy, hormóny, nukleové kyseliny (napr. DNA, RNA alebo ATP), v) súčasť biologických membrán (glykoproteíny a glykolipidy).

Sacharidy rozdeľujeme na monosacharidy (základné stavebné jednotky polysacharidov), oligosacharidy (počet monomérnych jednotiek je 2-10) a polysacharidy (zložené z viac ako 10 monomérnych jednotiek). Podľa počtu uhlíkov v reťazci delíme monosacharidy na triózy (3 uhlíky), tetrózy (4 uhlíky), pentózy, hexózy, a heptózy atď. Podľa výskytu ketónovej alebo aldehydovej funkčnej skupiny delíme monosacharidy na ketózy a aldózy. Podľa prítomnosti voľnej poloacetálovej skupiny v molekule delíme sacharidy na i) redukujúce a ii) neredukujúce. Redukujúce sacharidy majú voľný poloacetál a fungujú ako redukčné činidlá. Samé sa pritom oxidujú. Neredukujúce sacharidy nemajú voľný poloacetál, nedokážu sa premeniť na necyklickú formu s aldehydovou alebo ketónovou skupinou, zostávajú v cyklickej podobe. Nemôžu sa oxidovať. Prítomnosť voľnej poloacetálovej skupiny redukujúcich sacharidov sa využíva na dôkazové reakcie monosacharidov.

Monosacharidy sú bezfarebné kryštalické látky, dobre rozpustné vo vode alebo v zriedených roztokoch etanolu, nerozpúšťajú sa dokonca i v mierne polárnych, organických rozpúšťadlách. Je pre ne charakteristická viac či menej sladká chuť. Z chemického hľadiska to sú polyhydroxyketóny (ketózy) alebo polyhydroxyaldehydy (aldózy), pretože vo svojej štruktúre obsahujú ketónovú alebo aldehydovú funkčnú skupinu a hydroxylovú funkčnú skupinu. Najvýznamnejšie monosacharidy so šiestimi atómami uhlíka v molekule sú glukóza (aldóza) a fruktóza (ketóza).

Oligosacharidy delíme podľa počtu monomérov na disacharidy (2 monosacharidy, napr. sacharóza zložená z glukózy a fruktózy), trisacharidy (3 monosacharidy) a podobne. Monosacharidové jednotky sa spájajú glykozidovou väzbou. Medzi najznámejšie

oligosacharidy patria: sacharóza – repný cukor (glukóza + fruktóza), laktóza – mliečny cukor (galaktóza + glukóza), maltóza – melasový alebo sladový cukor (glukóza + glukóza) a rafinóza – súčasť repného cukru (galaktóza+fruktóza+glukóza).

Polysacharidy majú reťazcové molekuly zložené z veľkého počtu monosacharidových jednotiek (molekúl). Stavebnými jednotkami polysacharidov môžu byť rôzne monosacharidy a dokonca i ich deriváty, ale najčastejšie vyskytujúcim sa je glukóza. Vo vode sa iba ťažko rozpúšťajú, pričom tvoria iba nepravý koloidný roztok. V kyslom prostredí alebo pôsobením enzýmov sa štiepia na oligosacharidy alebo až na monosacharidy. Medzi najznámejšie polysacharidy rastlinného pôvodu patria celulóza (základná štruktúrna látka rastlín), škrob (základná zásobná látka rastlín), inulíny, pektíny, kyselina algínová. Polysacharidy živočíšneho pôvodu reprezentuje napr. glykogén (základná zásobná látka živočíchov, ale aj húb a baktérií), chitín (základná štruktúrna látka hmyzu, kôrovcov a húb), kyselina hyalurónová (dôležitá pri mnohých biologických a patobiologických procesoch ako sú napr. morfogénéza, oprava tkaniva a rast nádorov), heparín (zabraňuje zrážaniu krvi).

Cvičenie č. 1: Príprava sacharidového roztoku z ovocia

Teoretický úvod: Ovocie je veľmi vhodným prírodným zdrojom sacharidov. Práve sladká chuť ovocia svedčí o tom, že je v ňom obsiahnutých vysoký podiel monosacharidov. V ovocí pozorujeme, v závislosti od zrelosti (čím zrelšie ovocie, tým vyšší obsah sacharidov) a typu, vysoký podiel fruktózy a glukózy. Glukóza (aldohexóza) je veľmi rýchlym a efektívnym zdrojom energie a v rastlinných organizmoch vzniká ako produkt fotosyntézy. Fruktóza (ketohehexóza) sa nazýva aj ovocný cukor a ako veľmi dobrý zdroj energie pomáha telu rýchlo regenerovať po chorobe i psychickej záťaži. Monosacharidmi si ľudské telo jednoduchšie vytvorí zásoby energie a nespôsobujú prudké výkyvy hladiny cukru v krvi (dôležité pre ľudí trpiacich cukrovkou). Veľmi dobrými rastlinnými zdrojmi sacharidov sú napr. figy, banány (hlavne sušené), ananás, arónia, d'atle, jarabina, sušené jablká, hrozno.

Objekt: vzorka ovocia (napr. sušené figy, d'atle, hrozno, jablko alebo hruška).

Pomôcky: trečia miska, kadička, odmerný valec, filtračný lievik, filtračný papier, stojan na filtračnú aparatúru, svorka, lyžička, varič, Petriho miska.

Chemikálie: morský piesok, destilovaná voda.

Postup: Odvážime si 50 g ovocia (ak máme čerstvé ovocie, zbavíme ho pred vážením šupky a semienok). Ovocie najemno nastrúhame alebo nakrájame. V prípade sušeného ovocia po jeho odvážení ovocia nakrájame alebo nastriháme na malé časti. Ovocie preložíme do trecej misky a pridáme lyžičku morského piesku, aby sme urýchlili rozrušenie bunkových stien. Po homogenizácii ovocia pridáme do trecej misky 20 ml teplej destilovanej vody a zmes premiešame. Pripravíme si filtračnú aparatúru. Na urýchlenie filtrácie použijeme skladaný

filtračný papier. Zmes filtrujeme a zároveň ďalšími 30 ml teplej destilovanej vody premyjeme treciu miskú. Po prefiltrovaní získame sacharidový roztok ovocia, ktorý prikryjeme Petriho miskou a použijeme na ďalšie analýzy.

Doba trvania: 25 - 30 min.

Výsledok: Zapišeme postup a spôsob získania produktu. Zaznamenáme konzistenciu získaného roztoku a jeho vlastnosti (farba, vôňa, konzistencia a podobne), ktoré sú pozorovateľné zmyslami (zrak, čuch).

Cvičenie č. 2: Dôkaz prítomnosti redukujúceho sacharidu

Teoretický úvod: V prítomnosti oxidačných činidiel, kovových iónov ako Cu^{2+} a určitých enzýmov, monosacharidy podliehajú oxidačným reakciám. Oxidáciou aldehydovej skupiny aldóz vznikajú aldónové kyseliny. Pri oxidácii koncovej $-\text{CH}_2\text{OH}$ skupiny (primárna alkoholová skupina) sa tvoria urónové kyseliny. Výsledkom oxidácie oboch uvedených skupín sú aldárové kyseliny. Na to, aby došlo k oxidácii aldehydovej alebo keto- skupiny, je nutné, aby sacharid obsahoval voľný poloacetálový hydroxyl na C-1 alebo poloketálový hydroxyl na C-2. Tým sa zabezpečí to, aby mohol sacharid voľne prechádzať z cyklickej formy na otvorenú formu, ktorá je potrebná na priebeh oxidačnej reakcie. Takým sacharidom hovoríme, že sú redukujúce (samé sa oxidujú). Všetky monosacharidy sú redukujúce, čo sa využíva na ich dôkaz (dôkazové reakcie sacharidov).

Vystavením varu mono- a disacharidov obsahujúcich voľnú poloacetálovú hydroxyskupinu v silno alkalickom prostredí vznikajú ako medziprodukty tzv. reduktóny, ktoré redukujú komplexne viazané ióny ťažkých kovov (Cu^{2+} , Bi^{3+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Ag^+) a niektoré iné látky (kyselinu pikrovú, metylénovú modrú).

Na dôkaz redukujúcich sacharidov sa využíva Fehlingovo činidlo. Jeho nevýhodou je, že je nestále a tak sa vždy pred reakciou musí pripraviť čerstvé. Pri vare sacharidu s Fehlingovým činidlom sa vylúči žltočervená zrazenina Cu_2O a súčasne sa mení modré sfarbenie roztoku do zelena, zelenožltá až žltozelena.

Objekt: roztok sacharidu pripravený v cvičení č. 1, med, jablkový džús.

Pomôcky: stojan na skúmavky, skúmavky, kadičky, odmerný valec, tyčinka, pipeta, balónik, vodný kúpeľ.

Chemikálie: Fehlingov roztok I (40 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v 1000 ml vody) a Fehlingov roztok II (200 g vínanu sodnodraselného a 150 g NaOH v 1000 ml vody).

Postup: Pripravíme si stojan na skúmavky a štyri skúmavky, ktoré očísľujeme číslami 1 až 4. V kadičke rozmiešame 10 g medu v 30 ml destilovanej vody. Do 1. skúmavky napipetujeme 2 ml sacharidového roztoku. Do 2. skúmavky pridáme vodný roztok medu. Do 3. skúmavky

pridáme 2 ml jablkového džúsu. Do 4. skúmavky napipetujeme 2 ml destilovanej vody, to bude kontrolná vzorka. V kadičke zmiešame 1 ml Fehlingovho roztoku I a Fehlingovho roztoku II. Do každej skúmavky kvapneme dve kvapky Fehlingovho činidla. Farebnú zmenu v prítomnosti redukujúcich sacharidov pozorujeme po krátkej chvíli aj pri laboratórnej teplote, zohrievaním skúmaviek vo vodnom kúpeli však reakciu urýchlíme. Pozorujeme farebnú zmenu v prípade neredukujúcich sacharidov.

Doba trvania: 25 - 30 min.

Výsledok: Popíšeme zmeny, ktoré sme pozorovali v jednotlivých skúmavkách. Na základe výsledkov popíšeme, v ktorej skúmavke sme mali redukujúce sacharidy, prípadne na základe použitého materiálu aj aké sacharidy boli prítomné v danej vzorke.

Cvičenie č. 3: Špecifické dôkazové reakcie v sacharidových roztokoch

a) Dôkaz glukózy, špecifický dôkaz na aldózy

Teoretický úvod: Glukóza (hroznový cukor) je monosacharid patriaci medzi aldohexózy. Existuje v dvoch enantioméroch, D-glukóza a L-glukóza. V organizme má osobité postavenie, prúdi krvou a tým sa dostáva do celého tela. Glukóza je biela, kryštalická látka, rozpustná vo vode, sladkej chuti. Nachádza sa v rôznych častiach rastlín, najmä v zrelých plodoch. Je významným zdrojom energie a je ľahko stráviteľná. V lekárskej praxi sa využíva na prípravu injekčných a infúzných roztokov a hojivých masťí. Nachádza sa v ovocí, ovocných šťavách a mede.

Dôkazová reakcia špecifická pre glukózu je reakcia s jodidom draselným. Trijodid oxiduje aldózy a pritom sa vyredukuje jód (hnedá farba). Dôkaz glukózy v zásaditom prostredí je špecifický dôkaz pre aldózy. V prípade pozitívnej reakcie dochádza k hnedému zafarbeniu, pretože sa vyredukuje jód, ktorý je hnedej farby.

Objekt: Jablčná šťava, sacharidový roztok z ovocia, vodný roztok medu, destilovaná voda.

Pomôcky: Skúmavky, stojan na skúmavky, pipety s balónikom.

Chemikálie: Roztok jódu (I_2) v jodide draselnom (KI) ($c = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), roztok hydroxidu sodného (NaOH) ($c = 2 \text{ mol.dm}^{-3}$).

Postup: Pripravíme si štyri skúmavky, ktoré si očísľujeme. Do každej skúmavky dáme 2 ml roztoku jódu v KI a po kvapkách pridávame NaOH tak dlho, pokiaľ nevznikne z tmavohnedého svetložlté zafarbenie (stačí pridať jednu až dve kvapky zvyčajne, pridávame veľmi opatrne). Potom pridáme do 1. skúmavky 2 ml jablčnej šťavy. Do 2. skúmavky pridáme 2 ml sacharidového roztoku pripraveného v cvičení č. 1, do 3. skúmavky pridáme 2 ml

vodného roztoku medu a 4. skúmavka bude obsahovať 2 ml destilovanej vody ako kontrola. Pozorujeme vzniknuté farebné zmeny.

Doba trvania: 15 min.

Výsledok: Popíšeme zmeny v skúmavkách pri jednotlivých vzorkách. Vysvetlíme, či v niektorej vzorke pozorujeme prítomnosť glukózy a aký je pre toto konštatovanie dôkaz.

b) Dôkaz fruktózy, špecifický dôkaz na ketózy - Seliwanova reakcia

Teoretický úvod: Fruktóza (ovocný cukor) je najsladší cukor. V krvi sa rýchlejšie metabolizuje, preto ju môžu používať aj diabetici. Podobne ako glukóza je súčasťou ovocia (jahody, maliny, čučoriedky), zeleniny (melón, sladké zemiaky) a je podstatnou zložkou medu. Používa sa na sladenie cukroviniek, ovocných štiav, jogurtov, konzervovaného ovocia a mrazených dezertov.

Seliwanovova reakcia rozlišuje ketohexózy od aldohexóz. Ketohexózy dehydratujú rýchlo za vzniku 5-hydroxymetylfurfuralu, zatiaľ čo aldohexózy dehydratujú oveľa pomalšie. 5-hydroxymetylfurfural reaguje s rezorcinolom za vzniku tmavočerveného kondenzačného produktu: 5-hydroxymetylfurfural + rezorcinol → tmavo červený produkt.

Objekt: Jablková šťava, sacharidový roztok z ovocia, vodný roztok medu.

Pomôcky: Skúmavky, stojan na skúmavky, pipeta s balónikom, držiak na skúmavky, vodný kúpeľ, koncentrovaná kyselina chlorovodíková (HCl), rezorcinol.

Postup: Pripravíme si štyri skúmavky. Do 1. skúmavky napipetujeme 2 ml jablčnej šťavy, do 2. skúmavky 2 ml sacharidového roztoku získaného z ovocia, do skúmavky 3 pridáme 2 ml vodného roztoku medu a 4. skúmavka bude slúžiť ako kontrola, do nej pridáme 2 ml destilovanej vody. Do každej skúmavky pridáme opatrne a v digestore 2 ml koncentrovanej HCl. Potom pridáme do každej skúmavky na hrot špachtle rezorcinol a zohrejeme všetky skúmavky vo vodnom kúpeli. Pozorujeme vzniknuté zmeny.

Doba trvania: 15 min.

Výsledok: Zapišeme, aké farebné zmeny pozorujeme v každej skúmavke a v ktorej by vzhľadom k pozorovaným zmenám mohla byť prítomná ketóza. Vysvetlíme získané výsledky a priebeh reakcie s výsledným produktom.

Cvičenie č. 4: Dôkaz redukujúcich sacharidov (Tollensov test)

Teoretický úvod: Glukóza a fruktóza spôsobuje sladkú chuť ovocia v bunkovej šťave. Patria medzi monosacharidy s karbonylovou funkčnou skupinou, ktorá má redukčné vlastnosti. Keď

pridáme do cukorných extraktov plodov ľahko redukovateľné látky, vzniká typické sfarbenie alebo zrazenina.

Pri vzniku Tollensového činidla dochádza najskôr k reakcii dusičnanu strieborného a zriedeného roztoku amoniaku – vzniká šedá zrazenina oxidu strieborného, ktorá sa rozpúšťa v nadbytku zriedeného roztoku amoniaku, vytvára sa bezfarebný komplex – diamín strieborný katión.

V prípade prítomnosti redukujúceho sacharidu (ale aj akejkolvek voľnej aldehydovej skupiny) dochádza k oxidácii aldehydovej skupiny na danom sacharide, zároveň sa Ag^+ redukuje na Ag^0 . Pri tejto reakcii dochádza k vytvoreniu tzv. strieborného zrkadla na stenách skúmavky. Glukóza je redukujúci monosacharid, ktorý obsahuje aldehydovú skupinu – teda dochádza k oxidácii aldehydovej skupiny na karboxylovú skupinu. V prípade glukózy dôjde k oxidácii na kyselinu glukónovú. Sacharóza je disacharid, ktorý je tvorený glukózou a fruktózou spojených $\alpha(1\rightarrow2)$ glykozidovou väzbou. Aldehydové skupiny (presnejšie poloacetalové hydroxyly), ktoré by sa mohli oxidovať, sú zapojené do glykozidovej väzby, a preto sacharóza patrí medzi neredukujúce sacharidy, a teda sacharóza s Tollensovým činidlom nereaguje. Môžeme pozorovať bezfarebný roztok v skúmavke.

Poznámka: Zahrievaním roztoku sacharózy s Tollensovým roztokom nad kahanom alebo vodnom kúpeli, môže dochádzať k hydrolýze sacharózy. Sacharóza sa hydrolyzuje za vzniku glukózy a fruktózy – po dlhšej dobe dochádza i v tomto prípade k tmavnutiu obsahu skúmavky, ktoré je spôsobené reakciou glukózy a fruktózy s Tollensovým činidlom.

Objekt: Jablková šťava, sacharidový roztok z ovocia, vodný roztok medu.

Chemikálie: Tollensovo činidlo (amoniakálny roztok dusičnanu strieborného).

Pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, kvapkadlo, destilovaná voda, vodný kúpeľ, držiak na skúmavky.

Postup: Do troch označených skúmaviek v stojane napipetujeme po 2 ml sacharidových roztokov (jablková šťava v skúmavke č. 1, sacharidový roztok z ovocia v skúmavke č. 2, vodný roztok medu v skúmavke č. 3) a 4. skúmavka bude obsahovať 2 ml destilovanej vody (kontrola). Do každej skúmavky pridáme 2 ml Tollensovho činidla, ktoré si pripravíme tesne pred samotnou analýzou. Obsah skúmaviek zahrejeme vo vriacom vodnom kúpeli a pozorujeme vzniknuté zmeny.

Doba trvania: 25 min.

Výsledok: Zapišeme vzniknuté zmeny v jednotlivých skúmavkách a porovnáme výsledky s kontrolou (skúmavka č. 4). Vysvetlíme vzniknuté zmeny v prípade pozitívnej reakcie sacharidovej vzorky s Tollensovým činidlom.

Cvičenie č. 5: Dôkaz sacharidov (Molischova skúška)

Teoretický princíp: Molischova skúška slúži k detekcii všetkých sacharidov – reakcie umožňujú odlíšenie sacharidov od ostatných prírodných látok (napr.: lipidov, proteínov). Pozitívny výsledok poskytujú monosacharidy, disacharidy, oligosacharidy i polysacharidy. Di-, oligo- a polysacharidy môžu podliehať hydrolýze na monosacharidy vplyvom silnej minerálnej kyseliny (koncentrovaná kyselina sírová).

Molischova reakcia je všeobecný test na všetky monosacharidy, ktoré obsahujú päť a šesť atómov uhlíka. Test je založený na schopnosti monosacharidov podstupovať kyselinou katalyzovanú dehydratáciu za vzniku aldehydu. V prvom kroku sa účinkom koncentrovanej kyseliny sírovej tvorí z pentóz furfural a z hexóz 5-hydroxymetylfurfural. V druhom kroku kondenzuje furfural, resp. 5-hydroxymetylfurfural s dvoma molekulami α -naftolu (Molischovo činidlo), pričom vzniká fialovo sfarbený produkt. Rovnako aj disacharidy a polysacharidy dávajú pozitívny výsledok, keď sú hydrolyzované kyselinou na 5- a 6-uhlíkové monosacharidy.

Objekt: Jablková šťava, sacharidový roztok z ovocia, vodný roztok medu.

Chemikálie: Molischovo činidlo (10 % roztok 1-naftolu (α -naftol) v 96 % etanole), koncentrovaná kyselina sírová (H_2SO_4).

Pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, pipeta s balónikom, kvapkadlo, vodný kúpeľ.

Postup: Pripravíme si v stojane 4 skúmavky. Do 1. skúmavky pridáme 2 ml jablkového džúsu, do 2. skúmavky získaný sacharidový roztok z ovocia a do 3. skúmavky pridáme 2 ml vodného roztoku medu. 4. skúmavka obsahuje 2 ml destilovanej vody a slúži ako kontrola. Do každej skúmavky pridáme 2-3 kvapky Molischovho činidla. Nepretrepávame. Následne opatrne po stenách nalejeme v digestore do každej skúmavky 2 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Pracujeme opatrne a v rukaviciach. Pozorujeme vzniknuté zmeny.

Doba trvania: 30 min.

Výsledok: Zapišeme do protokolu pozorované farebné zmeny v jednotlivých skúmavkách. Vyhodnotíme a vysvetlíme, v ktorých skúmavkách sme dokázali prítomnosť sacharidov. Popíšeme priebeh reakcií a výsledný vzniknutý produkt. Porovnáme vzniknuté farebné zmeny v skúmavkách v porovnaní s kontrolou.

Cvičenie č. 6: Dôkaz sacharidov (Tymolova skúška)

Teoretický princíp: Sacharidy sa v prostredí silných minerálnych kyselín menia na fural a jeho deriváty, ktoré reagujú s tymolom, pričom vzniká karmínové zafarbenie.

Objekt: Jablková šťava, sacharidový roztok z ovocia, vodný roztok medu.

Chemikálie: 3 % etanolový roztok tymolu, koncentrovaná kyselina chlorovodíková (HCl), chlorid sodný (NaCl).

Pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, pipeta s balónikom, kvapkadlo, vodný kúpeľ.

Postup: Pripravíme sme štyri skúmavky a označíme ich číslami 1 až 4. Do 1. skúmavky napipetujeme 1 ml jablkovej šťavy, do 2. skúmavky 1 ml sacharidového roztoku, do 3. skúmavky 1 ml vodného roztoku medu a do 4. skúmavky 1 ml destilovanej vody (kontrola). Do každej skúmavky pridáme niekoľko kvapiek roztoku tymolu, 5 ml koncentrovanej HCl a niekoľko kryštálov NaCl. Obsah skúmavky zahrejeme.

Doba trvania: 15 min.

Výsledok: Zapišeme do protokolu pozorované farebné zmeny v jednotlivých skúmavkách. Vyhodnotíme a vysvetlíme, v ktorých skúmavkách sme dokázali prítomnosť sacharidov. Porovnáme vzniknuté farebné zmeny v skúmavkách v porovnaní s kontrolou.

Cvičenie č. 7: Dôkaz prítomnosti škrobu

Teoretický úvod: Škrob je rastlinná zásobná látka. Skladá sa z dvoch polysacharidov – lineárna amyloza (tvorí asi 20 % škrobu) a rozvetvený amylopektín (asi 80 % škrobu). Stavebnou jednotkou obidvoch zložiek je α -D-glukopyranóza. Škrob je biela prášková látka bez chuti a zápachu. Vyskytuje sa v rastlinách (zemiaky, obilie, rôzne zásobné orgány, plody a listy rastlín) ako rezervná látka. Patrí medzi biologicky a aj hospodársky najvýznamnejšie sacharidy. Má veľký význam pre výživu ľudsťva. V priemysle sa používa na výrobu lepidiel, na škrobenie vlákien a tkanín a v neposlednom rade v potravinárstve.

Amyloza je funkčnou zložkou škrobu. Je charakteristická svojimi nerozvetvenými reťazcami, pričom glukózové jednotky sú spojené α -1,4 glykozidovou väzbou. Z chemickej štruktúry vyplýva jej veľmi nízka rozpustnosť vo vode. Na jej solubilizáciu je nevyhnutné zvýšiť teplotu, čím dochádza k jej mazovateniu. Reaguje s jódom a vzniká intenzívne modré sfarbenie. Podstata tejto reakcie je v tom, že sa molekuly jódu dostávajú do dutín závitnice, čím sa mení ich schopnosť absorbovať svetlo.

Amylopektín je druhou významnou zložkou škrobu, ktorá sa nachádza najmä vo vonkajšej časti škrobových zŕn. Glukózové jednotky sú v amylopektíne viazané α -1,4 glykozidovou väzbou a v menšej miere sa vyskytujú aj α -1,6 väzby, čím dochádza k vetveniu reťazca. Amylopektín má výrazne vyššiu rozpustnosť vo vode.

Dôkazom prítomnosti škrobu je vznik tmavo modrého zafarbenia. Ide o vlastnosť, kedy sa jód v Lugolovom roztoku interkaluje do závitnicovej štruktúry škrobu. Je to rýchla a vizuálna, dôkazová reakcia škrobu. Tzv. „rozpustný škrob“ používaný napríklad na výrobu prípravkov na škrobenie prádla, niektorých práškových potravinových produktoch (ako sú napr. pudingy) alebo v lepidle Herkules dávajú s Lugolovým roztokom jemné ružovo-hnedé sfarbenie, čo je dôkazom prítomnosti dextrínov, ktoré sú štiepnymi produktmi škrobu a sú lepšie rozpustné vo vode než škrob. Používajú sa ako lepidlá.

Objekt: škrobový výluh zo zemiaku, ktorý pripravíme lúhovaním postrúhaného zemiaku v teplej destilovanej vode, izolovaný sušený zemiakový alebo kukuričný škrob.

Pomôcky: stojan na skúmavky, skúmavky, pipeta, balónik, laboratórna lyžička.

Chemikálie: Lugolov roztok.

Lugolov roztok sa pripravuje tak, že sa rozpustí jodid draselný (KI, 1,5 g) v 100 cm³ destilovanej vody a pridá sa jód (I₂, 0,5 g). Výsledný roztok sa používa na dôkaz prítomnosti škrobov (modrofialové sfarbenie) v roztokoch a pri iných cytochemických analýzach. Lugolov roztok z praxe poznáme ako dezinfekčný prostriedok používaný na dezinfekciu slizníc (*Solutio iodi aquosa, Solutio Lugoli*).

Postup: Do jednej skúmavky nasypeme lyžičku škrobu. Pridáme niekoľko kvapiek Lugolovho roztoku. Do ďalších dvoch skúmaviek nalejeme 2 ml škrobového výluhu. Prvú z tejto dvojice skúmaviek poriadne pretrepeme a pridáme niekoľko kvapiek Lugolovho roztoku. Druhú skúmavku za stáleho pretrepávania zahrievame vo vodnom kúpeli do varu. Necháme vychladnúť pod prúdom tečúcej vody alebo v kadičke so studenou vodou. Potom pridáme niekoľko kvapiek Lugolovho roztoku a premiešame. Kontrolou je skúmavka s destilovanou vodou, kde sme k 2 ml destilovanej vody pridali pár kvapiek Lugolovho roztoku. Pozorujeme farebnú zmenu prítomnosťou škrobu.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Popíšeme, ako sa správal škrob vo vodnom roztoku bez a počas jeho zahrievania. Popíšeme, kedy a za akých okolností došlo k farbeniu škrobu prítomnosťou Lugolovho roztoku. Popíšeme farebné zmeny v skúmavkách so škrobom v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Popíšeme vlastnosti škrobu.

Cvičenie č. 8: Škrobové zrná v rastlinných bunkách

Teoretický úvod: Škrobové zrná majú v rastlinných bunkách špecifický tvar v závislosti od rastlinného druhu. Na povrchu majú dvojitú obalovú membránu. Škrobové zrná z hľuzy zemiaka majú tvar lastúry. Vrstevnatú štruktúru škrobových zrn v parenchymatických bunkách hľuzy spôsobujú vrstvy škrobu s rôznym obsahom vody a teda aj s rôznym indexom lomu svetla. Škrobové zrná pšenice sú šošovicového tvaru a majú rôznu veľkosť, môžu byť veľké a malé. Škrobová zrná kukurice sú nepravidelné, mnohostranné, vo vnútri majú hviezdicovitú dutinku, ktorá je na povrchu zrna viditeľná ako hviezdicovitá trhlinka. Škrob je polysacharid, ktorý sa jódом farbí na modro. Na detekciu škrobových zrn sa používa v biologickom laboratóriu Lugolov roztok, ktorým sa škrobové zrná farbja na modro až fialovo. Ostatné časti bunky po farbení Lugolovým roztokom zostávajú bezfarebné.

Objekt: hľuza ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum* MILL.), zrno kukurice siatej (*Zea mays* L.), zrno pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.).

Pomôcky: mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, preparačná ihla, skalpel (alebo žiletka), pinzeta, filtračný papier, Lugolov roztok, kvapkadlo.

Postup: Kúsok ošúpanej hľuzy zemiaka opláchneme vodou a pomocou žiletky zhotovíme čo najtenší preparát (priesvitný). Preparačnou ihlou alebo pinzetou ho preniesieme na podložné sklíčko do kvapky vody a prikryjeme krycím sklíčkom. Prezrieme pod mikroskopom a zakreslíme bunky zemiakovej hľuzy, ktoré sú parenchymatické. Potom presávacou metódou aplikujeme na preparát Lugolov roztok a opäť pozorujeme pod mikroskopom. Zakreslíme bunky s typickými škrobovými zrnami. Podobne pripravíme preparát zo zrna kukurice siatej, pšenice letnej, prípadnej zásobného orgánu inej rastliny v kvapke vody a presávacou technikou aj v Lugolovom roztoku. V inom experimente zrno kukurice rozrežeme skalpelom a preparačnou ihlou alebo žiletkou vyškrabneme trochu múčneho obsahu (endosperm). Ten preniesieme do kvapky vody na podložnom sklíčku. Prikryjeme čistým krycím sklíčkom, odsajeme nadbytočnú tekutinu a pozorujeme. Obdobne pozorujeme škrobnatý endosperm iných rastlinných zdrojov. Porovnáme tvar škrobových zrn v bunkách jednotlivých objektov.

Doba trvania cvičenia: 20 - 30 min.

Výsledok: Zakreslíme alebo odfotíme pri menšom i väčšom zväčšení pozorované objekty pod mikroskopom. Popíšeme štruktúry a ich tvar, ktoré sa vyfarbili Lugolovým roztokom a zapíšeme rozdiely v tvare škrobových zrn medzi jednotlivými pozorovanými rastlinnými druhmi.

Cvičenie č. 9: Pozorovanie amyloplastov pod mikroskopom

Teoretický úvod: Škrob je polysacharid, ktorý sa jódom farbí na modro. V rastlinných bunkách sa ako zásobná látka ukladá v amyloplastoch, ktoré sú za normálnych podmienok, bez farbenia Lugolovým roztokom bezfarebné až biele. V bunkách sa Lugolovým roztokom farbía len škrobové zrná, ostatné časti bunky zostávajú bezfarebné. Tvar škrobových zrn je typický pre daný rastlinný druh. Škrobové zrná z hľuzy zemiaka majú tvar lastúry. Škrobové zrná pšenice sú šošovicového tvaru a majú rôznu veľkosť, rozlišujeme veľké a malé škrobové zrná. Škrobová zrná kukurice sú nepravidelné, mnohostranné, vo vnútri majú hviezdovitú dutinku, ktorá je na povrchu zrna viditeľná ako hviezdovitá trhlina.

Objekt: hľuza ľuľka zemiakového (*Solanum tuberosum* MILL.), zrno kukurice siatej (*Zea mays* L.), zrno pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.).

Pomôcky: mikroskop, podložné a krycie sklíčka, skalpel (alebo žiletka), pinzeta alebo preparačná ihla, filtračný papier, Petriho miska, Pasteurova pipeta, Lugolov roztok.

Postup: Kúsok ošúpanej hľuzy zemiaka opláchneme vodou a pomocou žiletky zhotovíme čo najtenší preparát (priesvitný). Na malú Petriho misku si kvapneme pár kvapiek Lugolovho roztoku. Preparačnou ihlou preniesieme rastlinný preparát do Lugolovho roztoku. Po pár sekundách ho vytiahneme a premyjeme v destilovanej vode. Vložíme na podložné sklíčko do

kvapky vody a prikryjeme krycím sklíčkom. Pozorujeme pod mikroskopom. Zakreslíme bunky s typickými škrobovými zrnami, ktoré sa vďaka naviazaniu I₂ z Lugolovho roztoku sfarbili do fialovo-modra. Podobne pripravíme preparát zo zrna kukurice siatej, pšenice letnej, prípadnej zásobného orgánu inej škrobnatej rastliny. Zrno kukurice rozrežeme skalpelom a urobíme tenký priečny rez s múčnym endospermom. Obdobne pozorujeme škrobnatý endosperm iných rastlinných zdrojov. Porovnáme tvar škrobových zrn v bunkách jednotlivých rastlinných objektov.

Doba trvania cvičenia: 25 min.

Výsledok: Fotografiou alebo nakresleným obrázkom zdokumentujeme pozorované amyloplasty jednotlivých rastlinných druhov. Popíšeme pozorované štruktúry i zmeny zafarbenia spôsobené Lugolovým roztokom.

Cvičenie č. 10: Škrobové zrná v rastlinách z rodu mliečnikovité

Teoretický úvod: Škrob je polysacharid predstavujúci zásobné látky vyšších rastlín. Škrob sa tvorí polymerizáciou glukózy tvorenej v procese fotosyntézy, pričom sa označuje ako asimilačný. Následne sa ukladá v zásobných orgánoch rastlín (plodoch, semenách, hľuzách, koreňoch ai.) a tento sa označuje ako škrob zásobný. V rastlinnej bunke je škrob uložený v špecializovanom type plastidov – v amyloplastoch vo forme škrobových zrn. Tvar a veľkosť škrobových zrn sú charakteristické pre konkrétne rastlinné druhy. Podľa počtu jadier rozlišujeme škrobové zrná jednoduché (jedno jadro) alebo zložené (viac jadier). Pri niektorých škrobových zrnách môžeme pozorovať jednotlivé vrstvy, z ktorých je škrobové zrno zložené – táto vrstevnatosť je daná rôznym obsahom vody. Po vyschnutí obsahujú zrná dutinu so vzduchom. Tvar a stavba škrobových zrn sú dôležitými rozlišovacími znakmi pri určovaní múky alebo zisťovaní kvality potravín. Škrobové zrná rastlín z rodu mliečnikovité majú neobvyklú štruktúru. Vo vyvíjajúcich sa škrobových zrnách sú tyčinkovitého tvaru a úplne vyvinuté zrná majú tvar stehennej kosti vo vnútri so zreteľnou dutinkou.

Objekt: rastlina z rodu mliečnikovité (*Euphorbia*) – prýštec ohnivý, prýštec najkrajší, mliečnik kolovratcový, mliečnik chvojkový a podobne.

Pomôcky: mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, preparačná ihla, skalpel (alebo žiletka) a pinzeta, filtračný papier, Lugolov roztok, kvapkadlo.

Postup: Skalpelom odrežeme kúsok vetvičky natívnej rastliny. Do kvapky destilovanej vody na podložnom sklíčku zachytíme kvapku vytekajúcej šťavy (latexu). Tekutinu prikryjeme krycím sklíčkom a prebytočnú tekutinu odsajeme kúskom filtračného papiera. Pozorujte tvar a veľkosť škrobových zrn a niekoľko ich zakreslíme. Presávacou technikou aplikujeme na preparát Lugolov roztok. Pozorujeme pod mikroskopom pri menšom i väčšom zväčšení Lugolovým roztokom zafarbené orgány, príp. organely.

Doba trvania cvičenia: 15 min.

Výsledok: Zakreslíme alebo odfotíme pozorované objekty pri menšom i väčšom zväčšení mikroskopu, pred i po aplikácii Lugolovho roztoku. Zapíšeme a vysvetlíme, čo sme pozorovali.

Cvičenie č. 11: Dôkaz asimilačného škrobu v chloroplastoch

Teoretický úvod: Primárne syntetizovaný škrob sa označuje ako asimilačný. Postupne sa transportuje do intenzívne rastúcich orgánov a tiež do zásobných orgánov rastlín, kde slúži ako rezerva v podobe zásobného škrobu. Ukladá sa v tzv. amyloplastoch, ktoré patria k najčastejšie sa vyskytujúcim bezfarebným plastidom (leukoplastom) v rastlinných bunkách. Vyskytujú sa v zásobných orgánoch rastlín, endosperme a klíčných listoch. Pod mikroskopom sú dobre viditeľné po zafarbení roztokom jódu (Lugolov roztok).

Objekt: lístky machu naložené v 96 % alkohole.

Pomôcky: mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, preparačná ihla, skalpel (alebo žiletka) a pinzeta, Lugolov roztok.

Postup: Zhotovíme natívny preparát lístku machu priamo v Lugolovom roztoku. Pozorujeme pri malom a veľkom zväčšení. Zakreslíme.

Doba trvania: 10 min.

Výsledok: V chloroplastoch zbavených chlorofylu alkoholovou extrakciou nájdeme fialové miesta dokazujúce prítomnosť škrobu. Zakreslíme a popíšeme, čo pozorujeme. V prípade použitia fotografie, popíšeme do protokolu, aké štruktúry sme identifikovali a pri akom zväčšení sme pozorovali objekt. Vysvetlíme, čo sme pozorovali.

Cvičenie č. 12: Dôkaz celulózy

Teoretický úvod: Celulóza je rastlinný polysacharid. Je to homoglykán, pretože základnou stavebnou jednotkou polyméru je monosacharid glukózy. Vyskytuje sa v rastlinnej ríši, kde tvorí podstatnú časť bunkových stien. Celulóza je hlavná stavebná látka rastlinných buniek a spolu s lignínom sa podieľa na stavbe sekundárnych bunkových stien. V niektorých organizmoch sa tvorí čistá celulóza (vlákna semien druhov rodu *Gossypium*), inde, napr. v dreve, je sprevádzaná ďalšími látkami, akými sú lignín, hemicelulózy a živícami.

V celulóze sú molekuly glukózy pospájané β -D-glykozidovými väzbami medzi C1 a C4 atómami monosacharidu. Molekuly sú nerozvetvené. Natívna celulóza sa skladá z 8-12 tisíc (niekedy až 25 tisíc) glukózových jednotiek. Reťazec môže byť dlhý až niekoľko μm a jeho „3D“ štruktúra tvorí tzv. micelu. Dvadsať až 40 reťazcov (micel) tvorí jednu mikrofibrilu s priemerom 10-25 nm. Mikrofibrily spolu s ďalšími komponentmi (hemicelulózy, pektíny) tvoria bunkovú stenu. Priestor medzi micelami a mikrofibrilami umožňuje pohyb vody,

malých molekúl a iónov do priestoru bunkovej steny. Táto stavba je charakteristická pre meristemické a intenzívne rastúce bunky. Pri diferenciácii sa začína tvoriť sekundárna bunková stena, ktorá sa vyznačuje vzájomne rovnobežnou orientáciou celulóзовých mikrofibríl.

Kyselina sírová hydrolyzuje celulózu, ktorá je hlavnou zložkou rastlinných pletív vyzretého rastlinného pletiva. Produktom hydrolýzy sú kratšie sacharidové reťazce až monoméry glukózy, ktoré sa jódom farbja na modro. Medzi bunkami zostávajú nesfarbené medzery, ktoré predstavujú strednú lamelu. Tá spája dvojice susedných bunkových stien a obsahuje látky pektínovej povahy.

Celulóza sa používa na výrobu papiera, obalových materiálov, hygienických potrieb a podobne. Pre väčšinu živočíchov (aj človeka) je celulóza nestráviteľná a v potrave predstavuje tzv. vlákninu, ktorá prejde cez tráviacu sústavu a následne sa z tela vylúči bez výraznejšej zmeny. Je to dôsledok toho, že živočichy nemajú enzýmy schopné štiepiť β -1,4 väzby medzi jednotlivými glukóзовými jednotkami. Jediné organizmy schopné spracovať celulózu sú baktérie a vláknité huby. Tieto majú enzýmy schopné celulózu štiepiť a dokonca použiť ako zdroj pre výživu. Prítomnosťou týchto organizmov spravidla v gastrointestinálnom trakte živočíchov, môžu aj tieto sprostredkovane využívať rastlinnú potravu ako zdroj výživy a energie. Podobne aj probiotické baktérie v ľudskom gastrointestinálnom trakte rozkladajú vybrané zložky vlákniny, pričom tvoria kyseliny s krátkym reťazcom, teda metabolity s pozitívnym vplyvom na ľudské zdravie.

Cvičenie č. 12a

Objekt: starší konárik bazy čiernej (*Sambucus nigra* L.), prípadne stonka drevnatej byliny (napr. vratič obyčajný (*Tanacetum vulgare* L)).

Pomôcky: mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, preparačná ihla, nožnice, Pasteurova pipeta, Lugolov roztok, 10 % roztok (v/v) kyseliny sírovej (H_2SO_4).

Postup: Veľmi tenký rez vnútorného pletiva konára položíme na podložné sklíčko s kvapkou Lugolovho roztoku a prikryjeme krycím sklíčkom. Prebytočnú tekutinu odsajeme kúskom filtračného papiera. Pod mikroskopom pozorujeme hnedé sfarbenie vlákien celulózy. Potom k okraju krycieho sklíčka opatrne kvapneme kvapku 10 % (v/v) roztoku kyseliny sírovej. Kyselina začne prenikať pod krycie sklíčko a jej postupné prenikanie sledujeme pod mikroskopom.

Doba trvania cvičenia: 10 min.

Výsledok: Zakreslíme, čo pozorujeme pod mikroskopom a správne popíšeme a vysvetlíme pozorované štruktúry.

Cvičenie č. 12b

Objekt: vnútorná pokožka cibule kuchynskej.

Pomôcky: mikroskop, podložné a krycie sklíčko, skalpel, pinzeta, nožnice, Pasteurova pipeta, Lugolov roztok, 10 % roztok (v/v) kyseliny sírovej (H₂SO₄).

Postup: Z vnútornej pokožky cibule pripravíme pomocou skalpela a pinzety štvorčeky s rozmerom približne 5 mm x 5 mm. Štvorček pokožky položíme na podložné sklíčko do kvapky Lugolovho roztoku a prikryjeme krycím sklíčkom. Pod mikroskopom pozorujeme bunky pokožky, ktoré zakreslíme do protokolu. Potom Lugolov roztok odsajeme a k okraju krycieho sklíčka kvapneme roztok kyseliny sírovej. Pozorujeme prenikanie kyseliny sírovej do objektu a zmenu sfarbenia bunkových stien. Zakreslíme do protokolu.

Doba trvania cvičenia: 15 min.

Výsledok: Zakreslíme pozorovaný objekt a správne ho popíšeme.

Cvičenie č. 12c

Teoretický princíp: Bavlnené prírodné vlákno je skrutkovito stočené, čo je pre bavlnu charakteristické a mikroskopom dobre viditeľné (na rozdiel od syntetického alebo vlneného vlákna). Po celej dĺžke môžeme vidieť dutinu so zvyškami cytoplazmy. Pri najväčšom zväčšení je na povrchu viditeľná jemne zvrásnená kutikula. Pôsobením chlórzinkjódu sa vlákno sfarbuje na modro až fialovo, čo je pozitívna reakcia na celulózu.

Celulóza je hlavnou zložkou rastlinných bunkových stien. Je to polysacharid, ktorý tvoria jednovláknové molekuly celobiózy. Počet jednotiek je v priemere 2000 - 10000. Molekuly celulózy tvoria lineárne reťazce a nerozpustné vo vode. Jód sa celulóza na rozdiel od škrobu nefarbí. Celulóza je rovnako ako škrob tvorená glukózovými jednotkami, ale jej chemická štruktúra je rozdielna.

Objekt: Kúsok bavlnenej priadze (nezameniť bavlnenú priadzu so syntetickým vláknom) alebo niekoľko vlákien vaty.

Chemikálie: chlórzinkjód.

Pomôcky: mikroskop, podložné a krycie sklíčko, preparačná ihla, pinzeta, skalpel.

Postup: Kúsok bavlnenej priadze rozstrapkáme preparačnými ihlami v kvapke chlórzinkjódu na podložnom sklíčku. Pre kontrolu priložíme na podložné sklíčko aj niekoľko vlákien vaty (vata je čistá celulóza). Pripravíme preparáty a pozorujeme pod mikroskopom.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Pozorujeme pod mikroskopom a zakreslíme štruktúru prírodného vlákna bavlny a celulózy. Zakreslíme a vysvetlíme farebné zmeny spôsobené chlórzinkjód.

Kontrolné otázky

1. Čo viete o monosacharidoch?

2. Ako by ste charakterizovali oligosacharidy?
3. Uvedte troch najvýznamnejších zástupcov monosacharidov, oligosacharidov a polysacharidov.
4. Aké sú to redukujúce sacharidy?
5. Aké sú funkcie sacharidov v ľudskom organizme?
6. Aké väzby sú medzi monomérmymi jednotkami v polysacharidoch?
7. Popíšte chemickú štruktúru glukózy.
8. Čo je škrob a z čoho sa skladá?
9. Uvedte rozdiel medzi amylózou a amylopektínom.
10. Pomocou čoho dokážete prítomnosť škrobu v rastlinných bunkách a čo je výsledkom tohto dôkazu?

Zaujímavosť

Svetlo je palivo pre život. Poháňa biochemické procesy potrebné k fotosyntéze, pri ktorej rastliny vytvárajú z vody (H_2O) sacharidy a kyslík. Chloroplasty v listoch zachytávajú energiu fotónov z červenej a modrej časti svetelného spektra a využívajú ju k oddeleniu protónov a elektrónov v molekulách vody cez membrány tylakoidov. Svetelná energia sa premieňa na energiu chemickú vo forme adenosíntrifosfátu (ATP) a nikotínamidadenínindinukleotiddifosfátu (NADPH), pričom sa uvoľňuje kyslík (O_2). Uhlík z CO_2 sa následne i) buď fixuje v skeletoch jednoduchých cukrov (monosacharidov) ako je napr. glukóza a fruktóza a tie sa potom spájajú a tvoria reťazovité štruktúry polysacharidov ako je celulóza a lignín alebo ii) ukladá ako zásobná energia vo forme škrobu v koreňoch, hlúzách alebo semenách. V noci stromy využívajú energiu nazhromaždenú počas dňa k produkcii organických látok. S využitím rozpustného dusíka obsiahnutého v koreňoch sa monosacharidy transformujú na aminokyseliny a následne na alkaloidy (liečivé i jedovaté), fenolové zlúčeniny (ako napr. salicyláty, vanilín, antokyány) a na polymérne látky ako sú napr. lignín a triesloviny. Rastliny taktiež dokážu redukovať sacharidy na lipidy, vďaka čomu sú schopné pre človeka produkovať rastlinné oleje.

PROTEÍNY

Proteíny patria medzi primárne metabolity. Sú to biomakromolekuly zložené z aminokyselín pospájaných **peptidovými väzba**, čím sa vytvára tzv. polypeptidový reťazec. Existuje 20 štandardných (tzv. proteinogénnych) aminokyselín, ktorých zaradenie do polypeptidového reťazca je "zapísané" v genetickej informácii. Vzájomné pôsobenie aminokyselín vytvára komplikovanú, ale prísne determinovanú trojrozmernú štruktúru proteínu so špecifickou funkciou. Ak je priemerná molekula proteínu zložená z 50 aminokyselín, ich kombináciou môže vzniknúť $20^{50} = 1,13 \cdot 10^{65}$ možných kombinácií, čo predstavuje nesmierne veľkú funkčnú variabilitu týchto štruktúr. Sekvencie aminokyselín jednotlivých proteínov sú v organizmoch kódované génmi, pričom jednu aminokyselinu môže kódovať aj viacero kodónov (tripletov). Reťazec proteínu je syntetizovaný procesom tzv. translácie (prekladu genetickej informácie z poradia nukleotidov v mRNA do poradia aminokyselín v polypeptidovom reťazci prostredníctvom genetického kódu), po ktorej nasleduje zbalenie proteínu (tzv. folding) do fyziologicky funkčnej trojdimenzionálnej štruktúry.

Proteíny sa delia na jednoduché a zložené. Jednoduché proteíny sú také, ktoré pozostávajú iba z aminokyselín. Obvykle majú asi 80 % C, 23 % O, 16 % N, 7 % H a 0,3 % S. Zložené proteíny obsahujú v molekulách okrem aminokyselín i ďalšie zložky: sacharidy (glykoproteíny), ióny kovu (metalproteíny), hem (hemoproteíny) a pod.

Proteíny sú zložené z α – aminokyselín. V proteínoch sa nachádza 20 rôznych druhov α – aminokyselín. Rastlina je schopná syntetizovať všetky α – aminokyseliny z jednoduchých anorganických zlúčenín. Organizmus človeka a ostatných živočíchov si nevie vytvoriť všetky α – aminokyseliny. Proteíny sú preto v potrave človeka nenahraditeľné, kým lipidy a sacharidy nemusí organizmus človeka na istý čas prijímať.

Proteíny, ktoré obsahujú všetky esenciálne α – aminokyseliny, sú plnohodnotné. Proteíny, ktorým chýba jedna alebo viac α - aminokyselín, sú neplnohodnotné a patria sem napr. proteíny rastlín. Organizmus človeka si nevie vytvoriť 8 α – aminokyselín, preto ich musí získavať zo stravy. Hovoríme im esenciálne (nenahraditeľné) α – aminokyseliny: **histidín, izoleucín, leucín, lyzín, metionín, fenylalanín, tryptofán a valín**.

V prípade proteínov je možné hovoriť o jednotlivých úrovniach ich štruktúry. Najzákladnejšia je **primárna štruktúra**, ktorá označuje len sekvenciu aminokyselín, ktoré tvoria molekulu proteínu. Zapisuje sa od N-konca po C-koniec, typicky jednopísmenovými skratkami aminokyselín. **Sekundárna štruktúra** hovorí o istom vybratom úseku polypeptidového reťazca a ide o lokálne priestorové usporiadanie atómov hlavného reťazca. Najčastejšie konformácie sú α -hélix a β -skladaný list. Úplné trojdimenzionálne usporiadanie atómov v proteíne sa nazýva **terciárna štruktúra**. Terciárna štruktúra zahŕňa celý polypeptidový reťazec. Aj aminokyseliny, ktoré sú navzájom v sekvencii veľmi vzdialené,

môžu v konečnom dôsledku interagovať v priestore a stabilizovať štruktúru proteínu, prípadne tvoriť jej dôležité funkčné miesto. **Kvartérna štruktúra** referuje o usporiadaní dvoch a viacerých polypeptidových reťazcov alebo podjednotiek v tzv. oligomérnych proteínoch.

Proteíny zastávajú v organizme pestrú paletu funkcií a podobne ako iné biomakromolekuly, sú pre život nevyhnutné. Sú dôležité pre energetický metabolizmus, bunkový cyklus, transportné mechanizmy, imunitu, bunkovú signalizáciu, majú regulačné aj stavebné funkcie.

Často sa vyskytujúcim javom (pozorovaným v domácnosti v kuchyni) je **denaturácia proteínov**. Pod pojmom denaturácia sa myslí taká zmena trojdimenzionálnej štruktúry proteínu, ktorá vedie ku strate jeho funkcie. Tento proces nastáva dôsledkom zmien konformácie polypeptidových reťazcov v molekule, pričom nedochádza k zmene primárnej štruktúry proteínu, ale mení sa kvartérna, terciárna a sekundárna štruktúra. Denaturácia môže byť vratná alebo nevratná. Prechod denaturovaného proteínu do natívnej formy sa nazýva renaturácia.

Denaturácia môže nastať:

- mechanickými faktormi (napr. dlhodobý mechanický pohyb pri miešaní vaječného bielka).
- fyzikálnymi faktormi (zvýšenou teplotou, sušením, rôznymi druhmi žiarenia, zmenou pH).
- chemickými faktormi (kyselinami, zásadami, soľami ťažkých kovov, organickými rozpúšťadlami ako etanol a acetón, denaturačnými činidlami ako močovina, guanidín, hydrochloridy a detergentmi).

Zvýšená teplota narúša slabé interakcie v molekule proteínu (predovšetkým vodíkové mostíky). Ide o kooperatívny proces – denaturácia jednej časti okamžite spôsobuje denaturáciu častí ostatných. Ak je denaturácia ireverzibilná, často dochádza k precipitácii (vyzrážaniu) proteínu. Za určitých podmienok môžu byť niektoré globulárne proteíny z denaturovaného stavu renaturované, a to ich navrátením do fyziologických podmienok.

Hlavné zdroje proteínov v domácnosti: *Strukoviny*, hlavne fazuľa, šošovica, hrach, sója, patria nielen k najlacnejším, ale aj k najzdravším potravinám. Sója a sójové proteíny majú v našej strave aj zdravotný význam, pretože pomáhajú predchádzať rakovine, cukrovke, vysokému krvnému tlaku a znižujú hladinu cholesterolu v krvi. *Vajíčka* sú zdrojmi plnohodnotných proteínov. *Mlieko a mliečne výrobky*, ako sú tvaroh, sýry, jogurty, obsahujú plnohodnotný proteín kazeín. Pre vysoký obsah vápnika sú hlavným zdrojom tejto látky v našej strave. Prinášajú do organizmu aj fosfor. *Bravčové mäso, hovädzie mäso, hydina, ryby* – sú hlavnými zdrojmi proteínov živočíšneho pôvodu. Proteíny sa nachádzajú v malých množstvách aj v obilninových produktoch ako je chlieb, pečivo, cestoviny, ryža a taktiež v zemiakoch.

Proteíny prijímané v potrave sú denaturované. Denaturované proteíny sú totiž ľahko stráviteľné a pritom si zachovávajú svoju výživnú hodnotu. Okrem toho má denaturácia proteínov praktický význam v potravinárstve a v domácnosti pri uchovávaní potravín.

Cvičenie č. 1: Denaturácia proteínov vaječného bielka

Teoretický úvod: Proteíny vo vajciach sú veľmi kvalitné, obsahujú všetkých osem esenciálnych aminokyselín v dobrom pomere. Avšak koľko z týchto proteínov dokáže ľudské telo využiť závisí od spôsobu, ako vajcia pripravíme. Surové vajcia napríklad poskytujú najmenšie množstvo využiteľných proteínov. Varenie vajec pomáha zlepšiť stráviteľnosť proteínov, pričom z uvareného vajca dokážeme zužitkovať až 90 % proteínov a zo surového len 50 %. Vajce veľkosti „M“ (54 až 62 gramov) obsahuje v priemere 7,5 g proteínov, pričom 70 % z nich tvorí vaječný albumín. Podľa odporúčaní zdravotníckych organizácií potrebuje priemerný muž so sedavým zamestnaním 56 g proteínov denne, priemerná žena 46 g denne. Pri zvýšených fyzických nárokoch sú tieto čísla dvojnásobné.

Objekt: slepačie vajce.

Pomôcky: Kadičky, lyžička, skúmavky, držiak na skúmavky, sklená pipeta, stojan na skúmavky, liehový kahan.

Chemikálie: 30 % vodný roztok modrej skalice ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$).

Postup: Zo slepačieho vajca oddelíme vaječný bielok a rozpustíme ho miešaním v kadičke v 25 ml vody. Do troch označených skúmaviek si pripravíme po 5 ml roztoku vaječného bielka. Do prvej skúmavky následne pridáme 2 ml roztoku modrej skalice, do druhej skúmavky prilejeme 2 ml etanolu a obsah tretej skúmavky jemne zahrievame nad kahanom. Pozorujte zmeny v skúmavkách.

Doba trvania: 15 min.

Výsledok: Podľa získaných výsledkov popíšeme, čo sme v jednotlivých skúmavkách pozorovali; aké procesy prebiehali v jednotlivých skúmavkách a čo je ich výsledkom.

Cvičenie č. 2: Štiepenie disulfidických väzieb pôsobením vysokej teploty

Teoretický úvod: Nielen vaječný bielok, ale aj žĺtok slepačieho vajca obsahuje proteíny (v priemere 15 - 17 %). Okrem nich sa v žĺtku nachádzajú hlavne lipidy (28 - 36 %) a voda (47 - 50 %). Základnou väzbou, ktorou sú proteíny syntetizované z aminokyselín, je peptidová väzba (CO-NH). Okrem tejto väzby sa v reťazcoch proteínov nachádzajú aj iné typy väzieb. Sú to najmä disulfidické väzby, ktorými sú pospájané rôzne časti jedného alebo viacerých peptidických reťazcov. Tieto priečne väzby sa môžu pôsobením vysokých teplôt rozpadáť a preto sa pri varení vo vajci tvorí sulfán (H_2S).

Objekt: dve slepačie vajcia.

Pomôcky: varič, vodný kúpeľ, kuchynský nôž.

Postup: Vo vodnom kúpeli bežným spôsobom uvaríme dve vajcia na tvrdo (približne 10 minút). Jedno vajce potom prudko ochladíme v studenej vode a druhé necháme voľne

vychladnúť na vzduchu. Vajcia olúpeme a rozkrojíme na dve časti. Pozorujeme, čím sa vajcia líšia.

Doba trvania: 25 min.

Výsledok: Zapišeme rozdiely medzi oboma vajcami a popíšeme, čo je príčinou sledovaných rozdielov.

Cvičenie č. 3: Izolácia proteínov z mlieka

Teoretický úvod: Kravské mlieko obsahuje v priemere 3,3 % proteínov. Okrem nich sa v mlieku nachádza aj mliečny sacharid a mliečne lipidy. Z jednotlivých proteínov sa v mlieku nachádza najmä kazeín a mliečny albumín. Kazeín (patrí medzi fosfoproteíny) sa v čerstvom mlieku nachádza viazaný s iónmi Ca^{2+} . Pridaním kyseliny octovej (kuchynský ocot je jej zriedený roztok) sa zmení pH roztoku na takú hodnotu, pri ktorej sa dosiahne tzv. izoelektrický bod kazeínu ($\text{pI} = 4,6$) a vďaka nulovému voľnému náboju sa vyzráža biela zrazenina - voľný kazeín, ktorý je takmer úplne bez vápnika. Po jej odfiltrovaní ostáva vo filtráte ďalší proteín - mliečny albumín. Tento je rozpustný vo vode a zráža - denaturuje sa - pri teplote $65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Objekt: kravské mlieko.

Pomôcky: Kadičky, skúmavka, lievik, filtračný papier, lyžička, držiak na skúmavky, kahan.

Chemikálie: 8 % roztok kyseliny octovej (CH_3COOH).

Postup: 50 ml mlieka rozriedime v kadičke s 25 ml destilovanej vody a prikvapkáme do roztoku niekoľko kvapiek roztoku kyseliny octovej (octu). Premiešame a pozorujeme vznik žltej zrazeniny. Vzniknutú zrazeninu odfiltrujeme. Filtrát zahrievame opatrne nad kahanom a pozorujte zmeny, ktoré v ňom prebiehajú.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Popíšeme, aké zmeny sme pozorovali v mlieku po pridaní roztoku kyseliny octovej a aké po zahriatí filtrátu. Vysvetlíme, čo je príčinou pozorovaných zmien.

Cvičenie č. 4: Dôkaz prítomnosti proteínov v semenách hrachu

Teoretický úvod: Strukoviny sú veľmi vhodným prírodným zdrojom rastlinných proteínov. Hrach siaty (*Pisum sativum* L.) má v porovnaní s ostatnými strukovinami pomerne nízky obsah proteínov, iba 7 %. Šošovica obsahuje napríklad 25 % a fazuľa približne 20 - 25 % proteínov v semene. Zo semien strukovín je možné extrahovať proteíny do vody. V slabo alkalickom roztoku sa proteíny rozpúšťajú. Keď neutralizujeme filtrát zriedenou kyselinou octovou, proteíny sa zrážajú. Keď vo filtráte bude väčšie množstvo kyseliny, proteíny sa opäť rozpustia. Na rozdiel od koagulácie varom (koaguláciou sa menia vlastnosti proteínov - denaturujú - ide o ireverzibilný dej) je v tomto prípade zrážanie proteínov dej reverzibilný.

Objekt: suché semená hrachu.

Pomôcky: trecia miska, kadička, skúmavky, stojan na skúmavky, kvapkadlo, lievnik, filtračný papier.

Chemikálie: 2 % vodný roztok hydroxidu draselného (KOH), kyselina octová (CH_3COOH), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), destilovaná voda.

Postup: 10 g suchých semien hrachu dôkladne rozotrieme v trecej miske a múčku nasypeme do kadičky. Hrachovú múčku zalejeme 50 ml destilovanej vody a 5 ml 2 % vodného roztoku KOH. O 30 min prefiltrujeme. Do prvej skúmavky s 5 ml filtrátu opatrne prikvapkáme pár kvapiek kyseliny octovej, do druhej skúmavky s 5 ml filtrátu prilejeme 2 ml etanolu. Pozorujeme vzniknuté zmeny vo filtrátoch.

Doba trvania: 50 min.

Výsledok: Popíšeme, aké zmeny sme pozorovali v proteínovom roztoku s prídavkom kyseliny octovej a aké zmeny nastali v roztoku vplyvom etanolu. Vysvetlíme, čo je príčinou vzniknutých zmien.

Cvičenie č. 5: Dôkaz prítomnosti aminokyselín obsahujúcich síru v mlieku

Teoretický úvod: Aminokyseliny alebo aminokarboxylové kyseliny sú organické zlúčeniny obsahujúce v molekule aminoskupinu (primárnu, sekundárnu či terciárnu) a karboxylovú skupinu (niekedy aj druhú aminoskupinu, druhú karboxyskupinu a ďalšie substituenty). Zo známych aminokyselín je proteínogénnych (tvoriacich proteíny) iba 20. Síra obsiahnutá v mliečnych aminokyselinách sa veľmi ľahko uvoľňuje pôsobením NaOH vo forme sulfánu, ktorý vytvára s octanom olovnatým ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) čiernu zrazeninu sulfidu olovnatého PbS.

Objekt: kravské mlieko.

Pomôcky: skúmavka, pipeta, kahan, držiak na skúmavku.

Chemikálie: 10 % roztok octanu olovnatého ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$), 10 % roztok hydroxidu sodného (NaOH).

Postup: K 1 ml roztoku octanu olovnatého pomaly pridáme roztok hydroxidu sodného, kým sa nerozpustí zrazenina vznikajúceho hydroxidu olovnatého. Pridáme 5-6 kvapiek mlieka a roztok v skúmavke zahrejeme. Pozorujeme, čo sa deje v skúmavke.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Popíšeme, čo sme pozorovali v skúmavke a ako si vzniknutú reakciu a produkt vysvetlíme. Okrem toho do protokolu vypíšeme aminokyseliny, ktoré obsahujú vo svojej molekule síru.

Cvičenie č. 6: Reakcie proteínov v kyslom a alkalickom prostredí

Teoretický úvod: Keď je v mlieku rozpustený hydrogénuhličitan sodný (NaHCO_3), proteíny v mlieku sa po pridaní roztoku kyseliny octovej (CH_3COOH) nevyzrážajú. Roztok v kadičke búrlivo pení, pretože vzniká CO_2 , ale zrazenina kazeínu nevzniká. Kyselina octová, ktorú pridávame do zmesi, reaguje s hydrogénuhličitanom sodným za vzniku octanu sodného, oxidu uhličitého a vody.

Objekt: kravské mlieko.

Pomôcky: kadička s objemom 50 ml, laboratórny valec, laboratórna lyžička, pipeta.

Chemikálie: hydrogénuhličitan sodný (NaHCO_3), 8 % roztok kyseliny octovej (CH_3COOH).

Postup: Do kadičky, do ktorej sme naliali 30 ml mlieka, nasypeme dve lyžičky hydrogénuhličitanu sodného (sódy bikarbóny). Dobre premiešame a potom prikvapkáme roztok kyseliny octovej (ocot). Pozorujeme.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Popíšeme, čo sme pozorovali v kadičke po pridaní jednotlivých chemických látok.

Cvičenie č. 7: Proteíny v pšeničnej múke

Teoretický úvod: V pšeničnej múke je prítomných približne 10 - 15 % proteínov. Medzi najdôležitejšie proteíny pšenice patrí gliadíny a gluteníny, ktoré tvoria tzv. lepok (glutén), hygroskopickú, pružnú a ťažnú hmotu. Glutén sa nerozpúšťa vo vode, vďaka čomu sa dá izolovať vyplavením škrobu v jemnom prúde vody. Lepok je zložený z nasledovných zložiek: gliadíny (43 %), gluteníny (39 %), iné proteíny (4 %), lipidy (3 %), sacharidy (2 %) a škrob (6 %) a jeho konzistencia je podobná žuvačke.

Objekt: pšeničná múka.

Pomôcky: kadička (širšia sklenená miska), husté plátno alebo gáza, papier, destilovaná voda.

Postup: Odvážime si 80 g pšeničnej múky. Na husté plátno alebo tri razy naskladanú gázu rozmeru približne 15 x 15 cm nasypeme múku. Múku mierne zalejeme destilovanou vodou a zmiesime do formy cesta. Zabalíme ju do gázy. Balíček preplachujeme pod tečúcou vodou alebo v destilovanej vode v sklenej miske dovtedy, kým vzniká mliečnobiely roztok. Ak nemáme k dispozícii tkaninu, múku vo forme cesta premývame pod tečúcou vodou v dlani. Akonáhle prestane vytekať biely roztok, proces ukončíme. Pozorujeme, čo zostane na plátne.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Popíšeme, čo sme pozorovali na plátne po ukončení premývania. Popíšeme konzistenciu a vlastnosti vzniknutej látky.

Kontrolné otázky

1. Čo sú proteíny, z čoho sú zložené a akými väzbami sú tvorené?
2. Popíšte:
 - a) jednoduché proteíny,
 - b) zložené proteíny.
3. Aké sú to esenciálne α -aminokyseliny? Vymenujte ich.
4. Čo je denaturácia a vplyvom akých faktorov môže nastať?
5. Popíšte štruktúru proteínov – primárnu až terciárnu.
6. Kedy je denaturácia proteínov vratná a kedy ide o ireverzibilný jav?
7. Aké väzby sa nachádzajú v proteínoch vaječného bielka?
8. Aké proteíny sa nachádzajú v mlieku?
9. Ako by ste dokázali prítomnosť proteínov v strukovinách?
10. Čo viete o lepku?

Zaujímavosť

Význam proteínov naznačuje už ich názov. Proteíny (označované aj ako bielkoviny) vychádzajú z gréckeho slova *proteois*, čo znamená *prvé miesto*. Proteíny zaoberajú viac ako 50 % hmotnosti sušiny väčšiny buniek a sú nápomocné pri všetkých dejoch, ktoré bunky vykonávajú. Využívajú sa ako štruktúrne látky na oporu. Napríklad hmyz a pavúky využívajú hodvábné vlákna k vytváraniu svojich kukiel a sietí. Kolagén a elastín tvoria vláknitú štruktúru v spojivových tkanivách zvierat a keratín je proteín vlasov, rohov, peria a ďalších derivátov kože. Zásobná funkcia proteínov je daná napríklad vaječným albumínom. Ako proteín vaječného bielka je využívaný ako zdroj aminokyselín pre embryo. Kazeín je proteín prítomný v mlieku a je hlavným zdrojom aminokyselín pre novorodencov cicavcov. Rastliny obsahujú zásobné proteíny v semenách. Transportné proteíny reprezentuje napr. hemoglobín. Proteín, ktorý obsahuje železo, je prítomný v krvi stavovcov a transportuje kyslík z pľúc do ostatných častí tela. Transportné proteíny sa nachádzajú aj v bunkových membránach a slúžia na aktívny transport látok do bunky a z bunky. Hormonálne proteíny majú za úlohu koordinovať aktivity organizmu. Inzulín je proteínový hormón vylučovaný pankreasom a napomáha regulovať koncentráciu sacharidov v krvi stavovcov. Receptorové proteíny slúžia ako odpoveď bunky na chemické podnety. Sú to proteíny zabudované do membrán nervových buniek a prijímajú chemické signály uvoľňované inými nervovými bunkami. Kontaktné proteíny majú zodpovednosť za pohyb. Najvýznamnejšie sú aktín a myozín a sú zodpovedná za pohyb svalov. Iné proteíny majú na starosti vlnenie organel nazvaných riasinky a bičičky, ktoré zabezpečujú pohyb mikroorganizmov. Protílátky „bojujúce“ s baktériami a vírusmi sú tiež proteínovej povahy a ich úloha je obranná. Enzymatické proteíny sa zapájajú selektívne do urýchľovania chemických reakcií a patria medzi ne napr. tráviace enzýmy, ktoré katalyzujú hydrolýzu polymérov prijatých potravou.

LIPIDY

Lipidy sú estery vyšších karboxylových (nerozvetvených) kyselín (nasýtených alebo nenasýtených) a alkoholov, resp. ich derivátov. Alkoholovou zložkou je najčastejšie glycerol (1,2,3–propántriol), sfingozín (nenasýtený aminoalkohol odvodený od oktadekánu), inozitol, vysokomolekulové jednoduché alkoholy s nerozvetveným reťazcom, steroly. Molekuly lipidov sú pomerne chudobné na kyslík. Rozpustné sú v organických rozpúšťadlách (benzén, éter, chloroform, n-hexán a podobne). Patria do skupiny nepolárnych molekúl biogénneho pôvodu a do skupiny primárnych metabolitov.

Lipidy sú nevyhnutné pre stavbu bunkových štruktúr a tkanív, sú zdrojom energie pre organizmus, chránia organizmus pred stratou tepla ako aj pred mechanickým poškodením, zúčastňujú sa na stavbe nervových buniek a obaľujú nervové vlákna, vytvárajú prostredie, v ktorom sú rozpustné látky inak nerozpustné vo vode (niektoré vitamíny, hormóny, liečivá, farbivá). Čisté lipidy sú bezfarebné látky bez chuti a zápachu. Ich vlastnosti ovplyvňujú vyššie mastné kyseliny.

Mastné kyseliny sú kyseliny viazané v lipidoch. V biochémií sa týmto názvom označujú vyššie monokarboxylové kyseliny. Mastné kyseliny sa delia podľa rôznych kritérií, napríklad podľa dĺžky reťazca alebo nasýtenia. Z chemického hľadiska sa nasýtené a nenasýtené mastné kyseliny rozlišujú v molekulárnej väzbe. Kým nasýtené mastné kyseliny v molekule neobsahujú žiadnu dvojitú väzbu (napr. kyselina palmitová alebo stearová), nenasýtené mastné kyseliny obsahujú buď jednu dvojitú väzbu (mononenasýtené) alebo viacero dvojitých väzieb (polynenasýtené) v molekule. Niektoré z polynenasýtených mastných kyselín sú esenciálne, to znamená, že ľudský organizmus si ich nedokáže sám vytvoriť, preto ich človek musí prijímať v strave. V prírode sa vyskytujúce mastné kyseliny majú väčšinou párnny počet uhlíkových atómov. Mononenasýtené mastné kyseliny sú reprezentované napr. kyselinou olejovou a erukovou. Polynenasýtené mastné kyseliny sú napr. kyselina alfa-linolenová a linolová.

Medzi lipidy zaraďujeme **tuky, oleje a vosky**. Tuky sú triglyceridy nasýtených mastných kyselín. Pri bežnej laboratórnej teplote sú pevné. Vyskytujú sa najmä v živočíšnom tkanive. Oleje, ktoré obsahujú v prevažnej miere kyselinu olejovú a iné nenasýtené mastné kyseliny, sú pri bežnej laboratórnej teplote tekuté. Vosky sú estery vyšších mastných kyselín a vyšších, najmä dvojsýtnych alkoholov, ako aj estery kyselín so sterolmi.

Oxidácia lipidov je proces oxidácie dvojitých väzieb nenasýtených mastných kyselín vzdušným kyslíkom. Výsledkom tohto procesu sú nežiaduce produkty, hlavne aldehydy a

ketóny, ktoré negatívne vplyvajú na organizmus a výrazne menia chuťový prejav a vôňu potravín obsahujúcich nenasýtené mastné kyseliny. Následkom je čiastočne alebo úplne znehodnotenie potraviny. Chemická podstata žltnutia je adícia molekuly O_2 vzdušného kyslíka na dvojitú väzbu mastnej kyseliny za vzniku peroxidu, s následkom štiepenia uhlíkového reťazca za vzniku dvoch koncových aldehydových skupín. Tekuté oleje s vysokým podielom nenasýtených mastných kyselín sú k oxidácii náchylnejšie než tuhé tuky. Oxidáciu podporuje pôsobenie ultrafialového žiarenia a môže byť tiež urýchlená vhodnými enzýmami. Oxidáciu tukov potlačujú antioxidanty. Dá sa spomaliť (nie úplne zastaviť) aj uložením potravín v chlade, na suchých miestach alebo mimo slnečných priestorov.

Adícia lipidov vodíkom (katalytická hydrogenácia karboxylových kyselín v lipidoch) na dvojitú väzbu slúži na prípravu stužených tukov z olejov. Hydrogenáciou sa nenasýtené karboxylové kyseliny menia z nenasýtených na nasýtené karboxylové kyseliny. V priemyselnej výrobe sa reakcia, ktorou pripravíme stužený tuk volá stužovanie tukov a táto reakcia prebieha pri zvýšenom tlaku a za pôsobenia katalyzátora niklu alebo platiny.

Hydrolýzou acylglycerolov sa štiepi esterová väzba, pričom sa uvoľňujú molekuly karboxylových kyselín a glycerol. Kyslá hydrolýza vzniká pôsobením silných minerálnych kyselín. Alkalická hydrolýza je spôsobená pôsobením hydroxidov, pričom vznikajú sodné alebo draselné soli mastných kyselín, ktoré sa nazývajú mydlá (preto sa reakcia nazýva zmydelnenie, saponifikácia). Enzymatická hydrolýza prebieha pomocou enzýmov označovaných ako lipázy alebo esterázy.

Cvičenie č. 1: Farbenie tukových kvapiek v bunkách Sudanovou čerňou

Teoretický úvod: Lipidy sú hydrofóbne látky rozpustné v tukoch a lipofilných rozpúšťadlách. Netvorí makromolekuly, spájajú sa do komplexov na základe hydrofóbnych interakcií. Z chemického hľadiska sú to estery alkoholov a vyšších mastných kyselín. Alkoholom je hlavne glycerol. Mastné kyseliny môžu byť nasýtené alebo nenasýtené. Jednoduché lipidy delíme na neutrálne tuky a vosky. Zložené lipidy sú fosfolipidy, steroidy a karotenoidy. Lipidy majú významnú štruktúrnu funkciu hlavne ako súčasť biologických membrán. Navyše sú významným zdrojom energie, majú regulačnú funkciu mnohých fyziologických reakcií a fyziologickú, napríklad v procesoch fotosyntézy.

Lipidy možno dokázať farbivom Sudanová čerň, ktoré je rozpustné v tukoch. Absorpciou na tuk dochádza k farebnej reakcii. Alternatívne sa ako náhrada Sudánovej černe môže použiť farbivo Sudan III (0,1 g Sudan III rozpustený v 50 ml 96 % EtOH) alebo Sudanová oranžová. V prvom prípade sa tuk sfarbí na *červeno*, v druhom na *oranžovo*, ale najvýraznejšie sfarbenie (*modročierne*) sa dosahuje Sudanovou čerňou. Pri dôkaze zložených lipidov typu *lecitínu* možno využiť fakt, že molekuly týchto lipidov obsahujú hydrofilný a hydrofóbny koniec. V dôsledku toho dochádza k neustálemu kontaktu s vodným prostredím, ktorá obklopuje hydrofilný koniec a molekula lipidu tak nasáva molekuly vody. Vzniknuté duté útvary sa nazývajú myelínové figúry. Tento jav možno sledovať v mikroskope bez akýchkoľvek špeciálnych úprav preparátu. *Cholesterol* možno vo vzorke dokázať farebnými

reakciami použitím kyseliny sírovej (červený prstenec) - Salkovského reakcia. Obdobne môžeme použiť anhydrid kyseliny octovej s kyselinou sírovou, čo sa prejaví modrozeleným zafarbením roztoku. Kvantitatívne (množstvo) možno lipidy stanoviť extrakciou organickým rozpúšťadlom.

Objekt: semená slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.), cibuľa kuchynská (*Allium sativum* L.), zelené riasy alebo machy, pekárenské kvasnice.

Pomôcky: mikroskop, podložné a krycie sklíčka, skalpel (alebo žiletka) a pinzeta, nožnice, prúžky (~1 x 5 cm) filtračného papiera, Pasteurova pipeta.

Chemikálie: 2 % (w/v) roztok Sudanovej černe (Sudan black) v alkohole.

Postup: a) Na opačné konce podložného sklíčka kvapneme po jednej kvapke Sudanovej černe. Do jednej kvapky farbiva prenesieme preparačnou ihlou tenký rez zo semena slnečnice a do druhej tenký (priesvitný) rez dužiny cibule. Farbíme približne 10 min. Preparáty prikryjeme krycím sklíčkom a prebytočnú Sudanovú čerň odsajeme pomocou presávacej metódy. Pozorujeme pod mikroskopom a zakreslíme bunky so zafarbenými tukovými kvapôčkami.

b) V malej kadičke pripravíme zelenú suspenziu rias alebo mliečne sfarbenú suspenziu kvasníc. Kvapku suspenzie prenesieme na podložné sklíčko a pridáme kvapku roztoku Sudanu III. Necháme pôsobiť niekoľko minút. Pripravíme mikroskopický preparát a pri vhodnom zaclonení kondenzora pozorujeme objektívom pri zväčšení 40 až 100-krát.

Doba trvania: 30 min.

Výsledok: Popíšeme pozorované objekty v prípade rastlinných mikroskopických objektov i suspenzie kvasiniek, ktoré sa vyfarbili pomocou Sudanovej černe alebo farbivom Sudan III. Vysvetlíme pozorované zmeny a popíšeme lipidové štruktúry, ktoré sme vyfarbili a pozorovali.

Cvičenie č. 2: Dôkaz prítomnosti tukov v semenách olejnin

Objekt: semená olejnin ako napr. slnečnica ročná, mak siaty, repka olejná.

Pomôcky: skúmavka, roztieračka s roztieradlom.

Chemikálie: alkoholový roztok Sudanu III, teplá destilovaná voda.

Postup práce: Nažky slnečnice zbavíme oplodia a niekoľko olúpaných semien rozdrvíme v roztieračke. Drvinu spláchneme teplou destilovanou vodou do skúmavky a dobre pretrepeme. Potom pridáme alkoholový roztok Sudanu III a necháme stáť.

Doba trvania: 25 min.

Výsledok: Popíšeme pozorované zmeny v kadičke spôsobené pridaním farbiva do lipidovej emulzie. Vysvetlíme, čo pozorované zmeny spôsobilo.

Cvičenie č. 3: Dôkaz prítomnosti tukov v semenách orechov

Objekt: orechy (vlašské, lieskové...)

Pomôcky: filtračný papier, 2 malé sklenené vaničky, kadička, nožnice.

Chemikálie: alkoholový roztok Sudanu III.

Postup práce: Olúpané orechy roztlačíme medzi dvoma filtračnými papiermi. Zvyšky semien odstránime. Filtračný papier, na ktorom sa objavila masťná škvrna, ponoríme do vaničky s nasýteným roztokom Sudanu III v etanole. Farbivo necháme asi 2 minúty pôsobiť. Potom papier premyjeme v etanole a opláchneme pod tečúcou vodou. Na druhý filtračný papier kvapneme pár kvapiek destilovanej vody a necháme na laboratórnom stole stáť. Pozorujeme oba filtračné papiere ihneď po experimente a na konci laboratórneho cvičenia. Porovnáme vzniknuté rozdiely.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Popíšeme a obrazovo zdokumentujeme pozorované zmeny na filtračnom papieri s prítomnosťou lipidov aj vody. Vysvetlíme vzniknuté rozdiely tesne po vykonaní experimentu a aj s časovým odstupom na konci cvičenia.

Cvičenie č. 4: Rozpusťnosť lipidov a dôkaz dvojitéch väzieb

Teoretický úvod: Lipidy sú hydrofóbne (odpuďujú vodu) a sú vo vode nerozpustné (tvoria emulzie). Príčinou je prítomnosť veľkých nepolárnych alifatických reťazcov vyšších masťných kyselín. Sú preto dobre rozpustné v nepolárnych organických rozpúšťadlách ako chloroform, éter, benzén, acetón a podobne. Zložitejšie lipidy môžu byť amfifilné molekuly. Nepolárne acylové zvyšky sú hydrofóbne, ale ďalšia zložka viazaná estericky na glycerol (napr. aminoalkohol cholín) je hydrofilná a teda vzniká časť hydrofóbna a časť hydrofilná.

Objekt: rastlinné oleje rôzneho pôvodu (slnečnicový, repkový, olivový, ľanový a iné).

Pomôcky: kadičky, odmerný valec, odmerná banka, sklenená tyčinka, tmavá zásobná fľaša, skúmavky, stojan na skúmavky, pipeta, balónik.

Chemikálie: benzín, chloroform, brómová voda.

Postup práce: Pripravíme si brómovú vodu, t. j. roztok brómu v destilovanej vode (0,1 M). Do 50 ml odmernej banky nalejeme 30 ml destilovanej vody a za stáleho miešania prilejeme 0,5 ml kvapalného brómu. Objem roztoku doplníme destilovanou vodou na 50 ml. Roztok uchováame v tmavej nádobe a v chlade, aby nedošlo k jeho rozkladu. Do každej z trochu skúmaviek nalejeme 1 ml rastlinného oleja. Do prvej skúmavky prilejeme 5 ml destilovanej vody, do druhej 5 ml benzínu a do tretej 5 ml chloroformu. Zmesi v skúmavkách pretrepeme a pozorujeme zmeny. Do štvrtej skúmavky nalejeme 2 ml rastlinného oleja a pridáme 2 ml brómovej vody. Pozorujeme.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Pozorujeme javy vzniknuté vo všetkých skúmavkách. Zapišeme pozorované zmeny v skúmavkách a vysvetlíme ich.

Cvičenie č. 5: Tepelný rozklad rastlinných olejov

Teoretický úvod: Dymový bod (alebo bod zadymenia) je hodnota oleja, kedy začína jeho chemický rozklad vplyvom vyššej teploty. Pozorujeme ho ako vznik dymu a olej sa začína prepaľovať a znižovať svoju nutričnú hodnotu i biologické vlastnosti. Zvyčajne živočíšne tuky, vzhľadom k vyššiemu podielu nasýtených väzieb, lepšie znášajú vyššie teploty. Rastlinné oleje obsahujú v porovnaní so živočíšnymi tukmi vyšší podiel nenasýtených väzieb a tak sa vyššej teplote rýchlejšie začínajú rozkladať. Pri tepelnom rozklade vznikajú mastné kyseliny, voda a akroleín, ktorý predstavuje najjednoduchší nenasýtený aldehyd. Vyznačuje sa špecifickým zápachom.

Objekt: rastlinný olej, glycerol, včelí vosk.

Pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, držiak, kahan, váhy, chemická lyžička, pipeta (kvapkadlo).

Chemikálie: hydrogénsíran sodný (NaHSO_4).

Postup práce: V skúmavke zmiešame 0,3 g hydrogénsíranu sodného s 5 kvapkami rastlinného oleja. Skúmavku zahrievame nad kahanom najskôr mierne a potom silnejšie. Čuchom sa presvedčíme, že zo skúmavky uniká akroleín (pracujeme v zapnutom digestore alebo v dobre vetranej miestnosti). Obdobný experiment uskutočníme aj s glycerom pre porovnanie a so včelím voskom.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Popíšeme vlastnosti akroleínu a spôsob jeho vzniku pri tepelnom rozklade rôznych typov lipidov. Popíšeme rozdiely v tepelnom rozklade rastlinných olejov a iných druhov lipidov.

Cvičenie č. 6: Zmeny pri žltnutí tukov

Teoretický úvod: Oxidatívna stabilita je dôležitý parameter v hodnotení kvality lipidov a je výrazne ovplyvnená profilom mastných kyselín (hlavne nenasýtených) a minoritnými zložkami účinkujúcimi ako stabilizátory, ktoré označujeme ako antioxidanty (tokoferoly a tokotrienoly), ktoré zvyšujú stabilitu oleja a tak zvyšujú jeho trvanlivosť a zníženú náchylnosť k oxidácii. Chemická podstata procesu oxidácie je adícia reaktívnej formy molekuly O_2 napr. zo vzduchu na dvojitzú väzbu mastnej kyseliny za vzniku peroxidu s následkom štiepenia uhlíkového reťazca za vzniku dvoch koncových aldehydových skupín. Takto vznikajú v lipide okrem voľných mastných kyselín aj aldehydy a ketóny, ktoré spôsobujú pokles funkčných vlastností a nutričnej hodnoty oleja, prípadne potraviny. Olej nadobúda nepríjemný zatuchnutý pach a chuť sa stáva trpká až štipľavá. Vzniknuté prchavé produkty oxidácie (aldehydy a ketóny) majú škodlivé účinky na ľudský organizmus a konzumované vo vyššej miere môžu pôsobiť až toxicky. Tekuté (rastlinné) oleje s vysokým podielom nenasýtených

mastných kyselín sú k oxidácii náchylnejšie než tuhé tuky. Oxidáciu podporuje pôsobenie ultrafialového žiarenia, vyššia teplota, vzdušná vlhkosť a môže byť tiež urýchlená vhodnými enzýmami.

Objekt: čerstvé a zožltnuté maslo.

Pomôcky: skúmavky, pipeta, nôž, sklenená tyčinka, váhy, kadička, vodný kúpeľ, lakmusový papierik, strička.

Chemikálie: technický lieh.

Postup práce: Do jednej skúmavky navážime 1 g čerstvého masla. Do druhej skúmavky navážime 1 g starého, zožltnutého masla. Obe skúmavky naplníme 5 ml technickým liehom a zahrievame vo vodnom kúpeli. Pipetou odoberieme pár kvapiek z každej skúmavky a zistíme pomocou lakmusového papierika pH. Pozorujeme a vyhodnotíme.

Doba trvania: 15 min.

Výsledok: Popíšeme rozdiely pozorované v skúmavke 1 a 2. Vysvetlíme zmeny pozorované v skúmavke so starým zažltnutým maslom.

Cvičenie č. 7: Tuky v mlieku

Teoretický úvod: Obsah proteínov v mlieku sa pohybuje v rozmedzí 2,9 až 3,6 %. Krmivo živočíchov produkujúcich mlieko úzko súvisí s obsahom proteínov v mlieku. Proteíny, ktoré sa nachádzajú v mlieku, nazývame srvátkové. Patria medzi ne β -laktoglobulín a α -laktalbumín a sú syntetizované v alveolách mliečnej žľazy. Epitelovými bunkami nie sú syntetizované imunoglobulíny a sérový albumín, pretože pochádzajú z krvi zvieratá. Mliečny tuk sa skladá prevažne z triacylglycerolov (asi 98 % z celkového množstva tuku), s drobnými čiastočkami fosfolipidov, cholesterolu, voľných mastných kyselín a mono- a diglyceridov mastných kyselín. Je tu tiež stopové množstvo karoténu, vitamínov rozpustných v tukoch - A, D, E a K a látok zodpovedných za charakteristickú chuť a vôňu. Triacylglyceroly sú relatívne jednoduché molekuly pozostávajúce z glycerolu, ktoré sú esterifikované z omega-3 mastných kyselín. Sú to nepolárne molekuly, teda vo vode nerozpustné. Majú zásadný vplyv na vlastnosti mliečneho tuku, ako je hustota a topenie profilu. Existuje mnoho rôznych typov triacylglycerolov v mliečnom tuku, ktoré sa značne líšia v molekulárnej hmotnosti a stupni nenasýtenosti. Obsah tuku v mlieku závisí od typu mlieka, či ide o mlieko nízkotučné, polotučné a podobne. Rozdiely sú aj medzi mliekom z rôznych živočíšnych zdrojov.

Objekt: plnotučné mlieko.

Pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, držiak, kahan, strička, nožnice, pipeta, striekačka, oddeľovací lievik.

Chemikálie: éter, etanol.

Postup práce: Skúmavku naplníme 5 ml plnotučného mlieka, na to navrstvíme 1 ml alkoholu a zohrievame asi 1 min. Po ochladení pridáme do skúmavky 4 ml éteru a silne pretrepeme. Počkáme, kým sa oddelia dve fázy. Fázu éteru obsahujúcu lipidy odsajeme pipetou a nakvapkáme na filtračný papier. Pozorujeme jav vzniknutý na filtračnom papieri.

Doba trvania: 15 - 20 min.

Výsledok: Popíšeme priebeh reakcie v skúmavke a popíšeme, čo pozorujeme na filtračnom papieri. Vysvetlíme pozorované javy.

Cvičenie č. 8: Reakcie cholesterolu

Teoretický úvod: Cholesterol patrí medzi lipidy, je to steroid. Jeho sumárny vzorec je $C_{27}H_{45}OH$. Názov pochádza z gréčtiny: *chole* znamená žlč a *stereos* znamená pevný, pretože cholesterol bol po prvýkrát izolovaný zo žlčových kameňov. Cholesterol je životne dôležitá látka, ktorá je súčasťou bunkových membrán, nervových obalov, steroidných hormónov a žlčových kyselín. Steroidy reagujú s acetanhydridom, kyselinou sírovou a s formaldehydom za vzniku farebných produktov. Takéto reakcie preto môžeme použiť na dôkaz prítomnosti cholesterolu vo vzorke.

Objekt: zdroj cholesterolu (napr. vaječný žltok, bravčová masť) .

Pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, pipeta, balónik, striekačka.

Chemikálie: koncentrovaná kyselina sírová (H_2SO_4), acetanhydrid ($C_4H_6O_3$), roztok formaldehydu s kyselinou sírovou (1:50, 1 diel 40 % roztoku formaldehydu a 50 dielov koncentrovanej kyseliny sírovej).

Postup práce: Do skúmavky dáme 1 g vzorky s obsahom cholesterolu. Opatrne podvrstvíme 1 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Chloroformová vrstva sa sfarbí na červeno a prejavuje sa v nej na dopadajúcom svetle zelená fluorescencia. Táto skúška sa nazýva Salkowského skúška na dôkaz cholesterolu. K 1 g cholesterolu pridáme do skúmavky opatrne 1 ml acetanhydridu a po premiešaní a ochladení 2 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Po premiešaní pozorujeme farebné zmeny od červenej cez modrú až po zelenomodrú. Je to Liebmannova-Buchardova reakcia. Formaldehydový test uskutočníme prídavkom 2 ml formaldehydu v kyseline sírovej k 2 g cholesterolu. Cholesterolová vrstva sa sfarbí do červena. Odsajeme ju a do vodnej vrstvy v skúmavke pridáme 2 kvapky acetanhydridu. Pozorujeme modré zafarbenie.

Doba trvania: 15 - 20 min.

Výsledok: Popíšeme priebeh reakcií a ich princípy. Zapišeme alebo zakreslíme, čo pozorujeme v jednotlivých skúmavkách.

Cvičenie č. 9: Olejová sopka

Objekt: pokrmový rastlinný olej, mletá červená paprika, saponát (napr. jar).

Pomôcky: odparovacia miska, lyžička na chemikálie, 10 ml odmerná banka, veľká kadička.

Postup práce: V porcelánovej odparovacej miske zmiešame olej s lyžičkou mletej červenej papriky. Množstvo oleja zvolíme podľa objemovej veľkosti banky, ktorú je potrebné úplne naplniť farebnou olejovou zmesou. Banku naplnenú farebnou zmesou ponoríme do kadičky so studenou vodou, tak aby hrdlo banky bolo aspoň 4 cm pod hladinou vody. Potom prikvapneme na povrch hladiny pár kvapiek saponátu. Pozorujeme.

Doba trvania: 15 min.

Výsledok: Pozorujeme vzniknutý jav a pokúsime sa ho vysvetliť na základe vlastností lipidov a ich reakcie s detergentom.

Kontrolné otázky

1. Čo sú lipidy a aký majú význam?
2. Čo znamená, že lipidy sú hydrofóbne a čo je príčinou tejto vlastnosti?
3. V akých rozpúšťadlách sú lipidy dobre rozpustné a prečo?
4. Akým roztokom (farbivom) by ste dokázali prítomnosť tukov?
5. Čo viete o mastných kyselinách?
6. Popíšte oxidáciu lipidov.
7. Popíšte adíciu lipidov.
8. Popíšte hydrolýzu lipidov.
9. Ako by ste pripravili olejovú sopku?
10. Aké prírodné zdroje lipidov poznáte?

Zaujímavosť

Cholesterol je najčastejšie sa vyskytujúci steroid u živočíchov. Celkové množstvo cholesterolu u priemerného dospelého človeka je približne 200 - 300 g. Kvôli relatívne komplikovanej štruktúre prešlo od jeho izolácie v roku 1775 viac ako 150 rokov, kým sa v roku 1932 podarilo určiť jeho štruktúru. Keďže cholesterol obsahuje 8 asymetrických centier a môže existovať v 256 stereoizomérnych formách, trvalo ďalších 23 rokov do určenia jeho kompletnej 3D štruktúry. Cholesterol je všeobecne rozšírený u eukaryotov, nevyskytuje sa u väčšiny prokaryotov. V relatívne vysokej koncentrácii sa vyskytuje v každej živočíšnej bunke a tvorí významnú časť jej plazmatickej membrány a moduluje jej fluiditu a permeabilitu (priepustnosť). Vo väčšej miere je prítomný v mozgu (tvorí asi 10 % jeho sušiny), v žlči, krvnej plazme (asi 2 mg/cm³), kde je esterifikovaný nenasýtenými mastnými kyselinami a tvorí súčasť plazmových lipoproteínov, ďalej v nadobličkách, nervovom tkanive, kde je súčasťou myelínových obalov nervových buniek, v mieche, vo vaječnom žltku a v tuku z ovčej vlny. Ľudská koža vylučuje až 300 mg cholesterolu denne ako ochrannú látku. Cholesterol tvorí hlavnú súčasť tzv. nezmydeliteľných podielov živočíšnych tukov. Kľúčový význam cholesterolu je daný tiež tým, že je východiskovou látkou pre biosyntézu ďalších dôležitých steroidov – žlčových kyselín, pohlavných hormónov a kalciferolov. Organizmus kryje časť spotreby cholesterolu príjmom z vonku (potravou), väčšinu však syntetizuje (denne vyrába viac než 1 g cholesterolu). Hladina cholesterolu je udržiavaná poklesom biosyntézy pri jeho príjme v potrave. Cholesterol sa z väčšej časti vylučuje po premene na žlčové kyseliny v pečeni. Nepremenená časť sa odbúrava činnosťou črevných baktérií, redukciou na koprostanol (5- β -cholestan-3- β -ol). Patologicky sa cholesterol ukladá v stenách krvných ciev (ateroskleróza) a v žlčových kameňoch.

NUKLEOVÉ KYSELINY

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je polymér tvorený štyrmi nukleotidmi líšiacimi sa prítomnosťou špecifických dusíkatých báz: purínové – adenín (A) a guanín (G) a pyrimidínové – cytozín (C) a tymín (T). Každý nukleotid obsahuje okrem dusíkovej bázy aj cukornú zložku – pentózu (deoxyribóza) a zvyšok kyseliny fosforečnej. Nukleotidy sú spojené do dlhých (nerozvetvených) vlákien tzv. fosfodiesterovou väzbou, ktorá vzniká medzi fosforom na zvyšku kyseliny fosforečnej a kyslíkom z hydroxylovej skupiny deoxyribózy susedného nukleotidu. Dve nukleotidové vlákna sa antiparalelne (t.j. protibežne orientované) spájajú do dvojitej pravotočivej závitnice (α -helix). Tieto dve vlákna sa v DNA udržiavajú spolu v závitnici vodíkovými mostíkmi tvorenými medzi bázami ležiacimi oproti sebe na susedných vláknach, pričom tieto väzby vznikajú vždy iba medzi A a T a medzi G a C, čo nazývame komplementaritou báz. Špecifické poradie nukleotidov v molekule DNA je podstatou schopnosti DNA niesť, uchovávať a odovzdávať dedičnú informáciu. Zatiaľ čo prokaryotické organizmy (baktérie) bez ohraničeného jadra majú DNA prítomnú v cytoplazme v tzv. jadrovej oblasti, pri vyšších organizmoch, ktorých bunky majú jadro oddelené od zvyšku cytoplazmy jadrovou membránou (eukaryonty), je DNA lokalizovaná v jadre bunky. V štádiu interfázy je nukleová kyselina rozptýlená v celom jadre ako chromatín. V priebehu delenia bunky (počas mitózy alebo meiózy) sa DNA kondenzuje a usporadúva do tzv. chromozómov. Malé množstvo DNA sa nachádza aj v mitochondriách a plastidoch.

Okrem deoxyribonukleovej kyseliny sa v živých organizmoch nachádza aj ribonukleová kyselina (RNA). Je tvorená jedným vláknom kovalentne naviazaných ribonukleotidov. Je biochemicky odlišiteľná od DNA vďaka prítomnosti dodatočnej hydroxylovej skupiny pripojenej ku každej pentózovej molekule reťazca a prítomnosti uracilu namiesto tymínu. Jednou z hlavných funkcií RNA je okopírovať genetickú informáciu z DNA (transkripcia) a fyzicky ju preniesť na miesto, kde dôjde k jej preloženiu (translácia) na výsledný proteín (priamo túto funkciu plní iba jedna skupina RNA, mediátorová RNA - mRNA). Okrem toho existuje v živých organizmoch transferová RNA - pomerne krátka RNA, ktorá prenáša

jednotlivé aminokyseliny na miesto tvorby proteínov v ribozómoch a ribozomálna RNA ako súčasť ribozómov

Mitóza alebo mitotické delenie je typ bukového delenie eukaryotickej bunky. Je to najčastejší spôsob delenia bunky, pri ktorom dochádza k presnému rozdeleniu chromozómov do dcérskych buniek. Bunka vstupuje do M-fázy bunkového cyklu vtedy, keď možno v jej jadre pozorovať štruktúrne zmeny chromatínu. Dovtedy beztvárá jadrová hmota dostáva začiatkom M-fázy vláknitú štruktúru spôsobenú viacnásobnou špiralizáciou DNA pomocou špeciálnych proteínov - histónov, ktorá sa označuje termínom **kondenzácia chromatínu**. Kondenzáciou chromatínu vznikajú mikroskopicky pozorovateľné chromozómy, ktoré sú najlepšie viditeľné v metafáze. M-fáza je charakterizovaná rozdelením jadra (**karyokinéza**), ktoré je nasledované rozdelením materskej bunky na dve dcérske bunky (**cytokinéza**). Mitóza zabezpečuje rovnomerné rozdelenie chromozómov do dcérskych buniek. Prebieha v niekoľkých dobre mikroskopicky odlišiteľných fázach: profáza, metafáza, anafáza a telofáza. Jednotlivé fázy plynule prechádzajú jedna do druhej, preto v mnohých prípadoch nemožno medzi nimi určiť ostrú hranicu. Vo väčšine buniek prebieha bezprostredne po telofáze **cytokinéza**. V živočíšnej bunke sa zhruba v ekvatoriálnej rovine, v ktorej boli usporiadané metafázické chromozómy, začína bunka zaškrcovať invagináciou plazmatickej membrány, až vzniknú dve oddelené dcérske bunky. Rastlinné bunky sa naproti tomu delia centrifugálne (od stredu). V ekvatoriálnej rovine sa z vezikúl Golgiho aparátu diferencuje plazmatická platnička, ktorá narastá smerom k okrajom, pričom obsahom vezikúl je materiál potrebný aj pre vznik bunkovej steny. Plazmatická membrána u živočíšnej bunky je tvorená pôvodnou membránou, zatiaľ čo u rastlín pochádza z membrány vezikúl Golgiho aparátu.

Cvičenie č. 1: Dôkaz kyseliny deoxyribonukleovej (DNA) v bunkovom jadre

Teoretický úvod: V cytológii sa chromozómy zviditeľňujú pomocou Feulgenovej reakcie, ktorá špecificky farbí DNA (Feulgenovo farbenie jadra). Jadrá buniek sa selektívne farbja metylovou zeleňou (zeleň s fialovým nádychom). Farbivo sa nedá odstrániť prepláchnutím vo vode, t.j. nejde len o adsorpciu. Kyselina octová v Strassburgerovej zmesi pôsobí ako fixačné činidlo (zráža nukleoproteíny), metylová zeleň sa zase viaže v stechiometrickom pomere na deoxyribonukleovú kyselinu (DNA), pokiaľ nie je depolymerizovaná (1 mol metylovej zelene sa viaže na 10 molov fosforu DNA).

Objekt: vnútorná pokožka cibule.

Pomôcky: mikroskop, podložné a krycie sklíčko, nožík a drevená doska (na prekrojenie cibule), pinzeta, skalpel, Pasteurova pipeta, prúžky filtračného papiera (~1 x 5 cm).

Chemikálie: Strassburgerova zmes (1 % metylovej zelene v 1 % vodnom roztoku kyseliny octovej).

Postup: Z vnútornej pokožky cibule pripravíme pomocou skalpela a pinzety štvorčeky s rozmerom približne 5 x 5 mm, ktoré vložíme do kvapky Strassburgerovej zmesi na

podložnom sklíčku. Prikryjeme krycím sklíčkom a po niekoľkých minútach pozorujeme pod mikroskopom. V prípade, že v preparáte je priveľa farbiva, môžeme ho odstrániť presatím preparátu vodou (presávacou metódou za použitia prúžku filtračného papiera).

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Zakreslíme pozorované objekty a správne popíšeme, čo sme pozorovali a pri akom zväčšení sme zaznamenané objekty pozorovali.

Cvičenie č. 2: Izolácia nukleových kyselín z rastlinného materiálu

Teoretický úvod: Mechanické rozdrvenie akejkoľvek vzorky biologického materiálu je dôležité pre jeho homogenizáciu a rozrušenie bunkových stien. Následkom toho sa môže uvoľniť obsah buniek (cytosol) a je možné analyzovať, pozorovať alebo extrahovať látky, prípadne organely v bunkách. Molekuly NaCl sú schopné svojimi chemickými vlastnosťami spôsobovať zhlukovanie nukleových kyselín. Alkohol spôsobí následne vyplávanie nukleových kyselín na povrch a ich vyzrážanie. Molekuly RNA sa nachádzajú v rastlinných vzorkách v oveľa väčšom zastúpení ako molekuly DNA. Sú však vzhľadom k svojej štruktúre veľmi labilné a za pomerne krátky čas ich môže degradovať laboratórna teplota, enzým RNA-áza nachádzajúci sa všade okolo a aj na rukách človeka.

Objekt: ovocie (banán, jahoda, kivi a podobne), ananásový džús.

Pomôcky: nožík a drevená doska, trečia miska, sklenená tyčinka, pipety, kadičky, skúmavky, pinzeta, filtračný papier.

Chemikálie: NaCl, domáci detergent (napr. jar), denaturovaný lieh, príp. izopropylalkohol alebo etylalkohol.

Postup: Odvážime si 50 g očisteného ovocia. Ovocie narežeme na malé kúsky a spolu s malým množstvom NaCl (na hrot lyžičky) rozdrvíme v trecej miske. Pre lepšie rozdrvenie pridáme do zmesi cca 15 ml destilovanej vody. Do kadičky si preniesieme približne 30 ml rozdrvenej zmesi čo najviac homogénnej a zbavenej hrubých častí. Na povrch kadičky nalejeme 1/6 objemu detergentu. Dobre rozmiešame, ale nie príliš, aby sme zabránili tvorbe peny, a necháme pôsobiť 10 min. Z tejto zmesi následne odlejeme 5 ml do skúmavky. Pridáme 5 kvapiek ananásového džúsu. Veľmi jemne zmes premiešame. Po stene skúmavky opatrne nalejeme do skúmavky 5 ml alkoholu (denaturovaný lieh, etylalkohol, izopropylalkohol a podobne). Nemiešame. Pozorujeme vyzrážanie nukleových kyselín v alkoholovej vrstve. Jemne vzniknutý útvar pinzetou vytiahneme na kúsok filtračného papiera.

Doba trvania: 45 min.

Výsledok: Popíšeme postup izolácie nukleovej kyseliny a popíšeme útvar, ktorý sme získali.

Cvičenie č. 3: Extrakcia DNA z biologického materiálu

Teoretický úvod: DNA (kyselina deoxyribonukleová) patrí medzi štyri najdôležitejšie polymérne organické látky v živej bunke (sacharidy, lipidy, proteíny, nukleové kyseliny). Je uložená v jadre v podobe chromozómov, kde je chránená jadrovou membránou. Má tvar dlhej dvojitej pravotočivej skrútkovnice a obtáča sa okolo histónových proteínov tvoriacich zložitú štruktúru solenoidov a oktamérov. Skladá sa z deoxyribózy, fosfátu a dusíkatých báz. Nachádza sa v každej bunke a je nevyhnutná pre jej život a rozmnožovanie. DNA je nositeľkou genetickej informácie bunky, riadi rast, delenie a regeneráciu bunky. Okrem hlavnej DNA, označovanej ako chromozomálna DNA, majú organizmy menšie molekuly DNA uložené v bunkových organelách alebo v krátkych do kruhu uzavretých úsekoch umiestnených v cytoplazme, tzv. plazmidoch. Genetická informácia zapísaná v DNA sa realizuje prostredníctvom dvoch základných krokov, a to transkripcie a translácie.

Objekt: živočíšny biologický materiál (mäso, sliny a podobne).

Pomôcky: kadičky, skúmavka, trojnožka, sieťka, kahan, vodný kúpeľ, sklená tyčinka, teplomer, roztieračka s roztieradlom, váhy, mikroskop, podložné a krycie sklíčko, pinzeta, preparačná ihla.

Chemikálie: tekutý detergent (napr. čistiaci prostriedok na riad), kuchynská soľ, čerstvo pripravený ananásový džús (bromelaín – protolytický enzým)/proteáza, denaturovaný alkohol, destilovaná voda, ľad.

Postup: Vzorku (množstvo cca 10 g) veľmi dobre rozotrieme v trecej miske, v prípade potreby použijeme lyžičku morského piesku. Do kadičky zmiešame 80 ml destilovanej vody a 3g kuchynskej soli. Sklenou tyčinkou zamiešame. Do kadičky pridáme 10 ml tekutého detergentu. V odmernom valci dolejeme destilovanú vodu do celkového objemu 100 ml. Premiešame, snažíme sa vyhnúť tvorbe peny. V kadičke zmiešame homogenizovanú vzorku s extrakčným roztokom. Zahrievame vo vodnom kúpeli na 60 °C. Pridáme 10 ml ananásového džúsu. Zmes ochladíme na 0 °C. Ochladenú zmes nalejeme do skúmavky (2 ml). Pridáme do skúmavky rovnaké množstvo ochladeného denaturovaného alkoholu. Nemiešame. Zmes necháme 5 min postáť, pričom môžeme kondenzované vlákna DNA jemne premiestniť do alkoholovej vrstvy. Získaný produkt preniesieme do kvapky vody na podložné sklíčko. Prikryjeme krycím sklíčkom a pozorujeme pod mikroskopom pri menšom a väčšom zväčšení.

Doba: 30 - 40 min.

Výsledok: Zdokumentujeme získaný produkt (fotografiou alebo zakreslením) a popíšeme postup, ako sme DNA izolovali. Zakreslíme a popíšeme, čo sme pozorovali pod mikroskopom.

Cvičenie č. 4: Mikroskopické pozorovanie fáz mitózy pomocou trvalých preparátov

Teoretický úvod: Začiatkom **profázy** sa homogénne sfarbené jadro začína meniť. Kondenzovaním chromatinu vznikajú mikroskopicky viditeľné vláknité chromozómy. Keďže v S-fáze (syntetickej) došlo k replikácii jadrovej DNA, každý chromozóm pozostáva z dvoch geneticky identických sesterských chromatíd spojených v oblasti centroméry proteínom kohezínom. Mizne jadierko. V blízkosti jadra sa nachádzajú dva centrozómy, z ktorých každý pozostáva z dvoch centriol. Replikácia centrozómov nastala ešte pred mitózou. Centrozómy predstavujú koordinačné centrá pre syntézu mikrotubulov. Polymerizovaním voľného tubulínu sa z centrozómov začnú rozchádzať vlákna mikrotubulov. Ak sa spoja mikrotubuly dvoch centrozómov, začnú sa centrozómy posúvať k protiľahlým pólom bunky. Sieť týchto mikrotubulov predstavuje deliace vretienko.

V neskoršej profáze pomenovanej ako **prometafáza** dochádza k rozrušovaniu jadrovej membrány a do jadra sa dostávajú mikrotubuly deliaceho vretienka, ktoré asociujú so vznikajúcimi kinetochórmami v oblasti centroméry chromozómov. Každý chromozóm má dva kinetochóry (každá chromatida má svoj kinetochór), keďže v ďalšom štádiu je potrebné chromatidy od seba oddeliť a každú pritiahnúť na iný pól bunky. (Vlákna deliaceho vretienka, ktoré smerujú od jedného centrozómu po druhý, sú tvorené nekinetochórovými mikrotubulmi. Tie mikrotubuly, ktoré asociujú s kinetochórmami chromozómov, sú kinetochórové mikrotubuly.) V neskoršej profáze sa chromozómy ďalej špiralizujú, skracujú a hrubnú.

V **metafáze** sú chromozómy maximálne špiralizované. Koncom metafázy sú usporiadané do tzv. ekvatoriálnej roviny, ktorá sa nachádza v strede bunky. Toto typické usporiadanie je dané odpudivými silami mikrotubulov centrozómov, ktoré sa od seba odtláčajú a kinetochórové mikrotubuly pritláčajú chromozómy k sebe. V metafáze sa nachádza mitotický kontrolný uzol, ktorý kontroluje, či sú kinetochórové mikrotubuly deliaceho vretienka pripojené na všetky chromozómy. Kým sa tak nestane, nie je možný prechod do ďalšej fázy - separácie chromatíd.

Pripojenie kinetochórových mikrotubulov na všetky chromozómy, resp. chromatidy, je signálom pre začiatok rozchádzania sa chromatíd, ktorým začína **anafáza**. Prvou fázou je odbúranie proteínu kohezínu, ktorá drží pokope sesterské chromatidy v oblasti centromér, a postupné skracovanie kinetochórových mikrotubulov, čo má za následok odťahovanie chromatíd od seba. V druhej fáze sa ďalším predlžovaním nekinetochórových mikrotubulov deliaceho vretienka dostanú chromatidy, teraz už nazvané dcérske chromozómy, k opačným pólom bunky. Tieto dve fázy sa niekedy nazývajú aj skorá a neskorá anafáza.

V **telofáze** v podstate dochádza k opačným procesom, aké prebiehali v profáze. Nekinetochórové mikrotubuly sa ďalej predlžujú, čo spôsobuje až predlžovanie celej bunky. Okolo chromozómov na oboch pólach sa diferencuje jadrová membrána a chromozómy sa postupne dekondenzujú na stav chromatinu, aký mali pred začiatkom profázy. Vytvára sa jadierko.

Objekt: trvalé preparáty.

Pomôcky: mikroskop.

Postup: Vyberieme si trvalé preparáty prezentujúce jednotlivé fázy mitózy eukaryotických buniek rastlinného alebo živočíšneho pôvodu. Preparáty pozorujeme pod mikroskopom najskôr pri malom zväčšení (10x) a postupne pri väčšom zväčšení (100x). Sledujeme jednotlivé fázy delenia.

Doba: 20 min.

Výsledok: Zakreslíme alebo odfotíme jednotlivé pozorované preparáty dokumentujúce jednotlivé fázy bunkového delenia. Popíšeme jednotlivé fázy a vysvetlíme rozdiely medzi rastlinnými a živočíšnymi bunkami v mitotickom delení.

Cvičenie č. 5: Mikroskopické pozorovanie fáz mitózy

Objekt: koreňový vrchol cibule.

Pomôcky: Petriho misky, preparačné ihly, kvapkadlo, podložné a krycie sklíčko, pinzeta, preparačná ihla, mikroskop, filtračný papier.

Chemikálie: fixačná zmes (etanol : koncentrovaná kyselina octová; 3:1), maceračná zmes (etanol : HCl; 1:1), acetokarmín (metvlénová modrá).

Postup: Z vyrastených korenkov cibule odrežeme asi 0,5 cm dlhé časti a preparačnou ihlou preniesieme do fixačnej zmesi. Fixujeme asi 15 min, potom korenky preniesieme do maceračnej tekutiny na dobu 10 min. Nakoniec ich preplachujeme v destilovanej vode najmenej 10 min. Z vypraného koreňka odrežeme nadbytočnú časť tak, aby na podložnom sklíčku zostala len asi 2 mm časť s rastovým vrcholom. Na túto časť kvapneme farbivo acetokarmín a priložíme krycie sklíčko. Slabým tlakom na krycie sklíčko korenok roztlačíme, aby sa izolované bunky rozostúpili do roviny. Nadbytočné farbivo odsajeme kúskom filtračného papiera. Potom zaostríme pri menšom zväčšení (10x) a pozorujeme a zakreslíme pri najväčšom zväčšení (100x).

Doba: 60 min.

Výsledok: Zakreslíme alebo odfotíme jednotlivé fázy a popíšeme ich. Podľa pozorovaných objektov pod mikroskopom identifikujeme jednotlivé fázy mitotického delenia.

Kontrolné otázky

1. Popíšte rozdiely v cytokinéze medzi rastlinnou a živočíšnou bunkou.
2. Popíšte princíp karyokinézy a cytokinézy.
3. Definujte profázu.
4. Definujte metafázu.
5. Definujte anafázu.
6. Definujte telofázu mitotického delenia.

7. Kedy sú chromozómy najlepšie viditeľné pod mikroskopom?
8. Akú zmes by ste použili na fixáciu buniek pri pozorovaní mitózy?
9. Akú zmes by ste použili na maceráciu buniek pri pozorovaní mitózy?
10. V čom vidíte význam bunkového delenia?

Zaujímavosť

Podstatou vzniku rakoviny je zmena genetickej informácie a regulačných mechanizmov v bunke. Toto vedie k nekontrolovanému deleniu bunky, vzniká celý nový klon takto „postihnutých“ nekontrolovateľne sa množiacich buniek. Tumor-supresorové gény (označované tiež antionkogény alebo recesívne onkogény) sú zodpovedné za syntézu proteínov, ktoré chránia zdravú bunku pred nekontrolovateľným delením a nádorovú bunku zasa dokážu prinútiť k samovražde. Proteíny kódované tumor-supresorovými génmi majú teda antiproliferačný účinok (t. j. zabraňujú neregulovanému deleniu nádorových buniek), podporujú diferenciáciu (funkčnú špecializáciu) buniek, opravu mutáciou poškodenú DNA a apoptózu (geneticky regulovanú bunkovú samovraždu). Ako prvý bol objavený tumor-supresorový gén, ktorý bol nazvaný retinoblastomový gén (v odbornej literatúre označovaný skratkou Rb) a zodpovedal za syntézu tzv. retinoblastómového proteínu (RB-proteín). Spolu s ďalším tumor-supresorovým génom TP53, kódujúci proteín p53, fungujú ako „brzdy“ bunkového delenia. Ak obidve alely Rb génu mutujú (menia sa na recesívne), vzniká nádor oka (retinoblastóm). Názov mutátorové gény pochádza z anglického názvu „mutator“, čo znamená, že takýto gén veľmi často podlieha genetickej zmene – mutácii. Nezmutované mutátorové gény sú pre každú bunku veľmi dôležité, pretože zabezpečujú správne fungovanie reparačných (opravných) mechanizmov. Mutácie alebo inaktivácie mutátorových génov spôsobujú hromadenie všetkých mutácií v bunke a tak podmieňujú tzv. nestabilitu genómu (jednu z dôležitých podmienok iniciácie karcinogenézy).

RASTLINNÉ FARBIVÁ

Rastlinné farbivá (*pigmenty*) sú zložité organické látky, ktoré absorbujú žiarenie v určitom rozsahu vlnových dĺžok vo viditeľnej oblasti elektromagnetického žiarenia. Farbivá, ktoré sa nachádzajú v rastlinných bunkách, sa delia na: (1) hydrochrómy a (2) lipochrómy.

Hydrochrómy sú hydrofilné farbivá dobre rozpustné v polárnych rozpúšťadlách (H₂O, NH₃, HCl, H₂SO₄ a i.) a nachádzajú sa v špeciálnych vakuolách v bunke. Túto veľkú skupinu rastlinných farbív môžeme na základe štruktúry jednotlivých látok rozdeliť na chalkóny, dihydrochalkóny, flavóny, flavanoly, izoflavóny, antokyány, auróny a ďalšie (Tabuľka 1). V kvetoch slúžia ako atraktanty (na prilákanie hmyzu), ale zúčastňujú sa aj na oxidačno-redukčných reakciách.

Tabuľka 1: Vybrané skupiny flavonoidov a ich farebný prejav.

Skupina	Zdroje	Farba
Flavóny	Červené víno, plody hlohu, paradajky, zeler, petržlen, citrusy, olivy	Krémové
Antokyanidíny	Bobuľoviny, červené víno, červené hrozno, červený grep, čerešne, jahody, čučoriedky, kvety pelargónie, červené kapusta	Červené a modré
Chalkóny	Chmeľ, rastliny rodu <i>Glycyrrhiza</i>	Žlté až oranžové
Auróny	Žlto sfarbené plody ovocia a zeleniny	Žlté, zlatožlté

Lipochrómy sú hydrofóbne farbivá, ktoré sa dobre rozpúšťajú v nepolárnych rozpúšťadlách (etanol, benzén, benzín). V bunke sa nachádzajú v plastidoch, resp. ich membránach: chloroplastoch, chromoplastoch a chromatofóroch. Nazývajú sa preto aj plastidové farbivá. Majú dôležitú úlohu nielen v procese fotosyntézy, ale aj pri raste a vývine rastliny. Patria sem chlorofyly, karotenoidy a fykobilíny. Z chemického hľadiska je možné ich deliť do dvoch skupín: (a) dusíkaté plastidové farbivá a (b) bezdusíkaté plastidové farbivá.

Molekuly dusíkatých farbív sú derivátmi porfyrínu, ktorých štruktúra sa skladá zo štyroch pyrolových jadier. Sem patrí skupina chlorofylov a fykobilínov. Bezdusíkaté farbivá sú

uhľovodíkmi polyénového typu, ktoré môžu byť acyklické alebo cyklické. Sem patria karotenoidy a xantofyly.

Chlorofyly sú základnou podmienkou fotosyntézy (pri vývoje nižších rastlinách sa namiesto chlorofylov nachádzajú fykokyány a fykoerytríny). Veľmi dobre sa rozpúšťajú v alkohole, dietyléteri, acetóne a benzéne. V polárnych rozpúšťadlách chlorofyly fluoreskujú. V *chloroplastoch* rastlín sa nachádzajú hlavne *chlorofyl a* a *chlorofyl b*. Rastliny, v ktorých je v prevahe chlorofyl a, majú lístie sfarbené na tmavozeleno až modrozeleno. Chlorofyl b sfarbuje lístie bledšou zelenou farbou. Ročne sa rozloží na celom svete asi 300 miliónov ton chlorofylu. Na jar sa zosyntetizuje takéto isté množstvo nového chlorofylu.

Karotenoidy sú lipofilné nehydrolyzovateľné *žlté až červené* sfarbené látky, ktoré sa vyskytujú v plodoch, kvetoch a listoch rastlín (kvety púpavy, plody rajčiaka, korene mrkvy ai.). Veľmi dobre sa rozpúšťajú v nepolárnych rozpúšťadlách (hexán, petroléter, benzén, chloroform a pod.) a v tukoch. Názov karotenoidy dostali v roku 1931, kedy sa z mrkvy (*Daucus carota* L.) izoloval prvý karotén. Skupina karotenoidov má dnes vyše 70 druhov substancií. Chemicky sú to tetraterpény. Majú teda základnú štruktúru C₄₀.

Xantofyly sú deriváty karotenoidov. Rozhodujúce je pritom postavenie – umiestnenie kyslíka. Medzi xantofyly patrí aj violaxatín, ktorý je východiskovou látkou pre syntézu kyseliny abscisovej. Tým sa uzatvára kruh látok, ktoré sa zúčastňujú na sfarbení lístia stromov.

Cvičenie č. 1: Pozorovanie chloroplastov

Teoretický úvod: Machy sú taxón patriaci medzi machorasty. Majú najdokonalejšiu stavbu tela spomedzi stielkatých rastlín. Gametofyt tvorí diferencovaná stielka (pakorienky, pabyľka a palísky). Sporofyt predstavuje stopka s výtrusnicou. Machy sú starobylé rastliny, ktoré sú ukázkou prechodu vodných rastlín k suchozemským. Zaraďujú sa medzi vyššie rastliny, lebo majú zložitejšiu stavbu tela ako riasy. Ich telo ešte nemá vyvinutý dokonalý vodivý systém, preto nemajú pravé orgány. Vodu nasávajú povrchom celého tela. V prostredí, kde sa vyskytujú, majú funkciu zásobárne vody. V prírode regulujú hospodárenie s vodou, zadržiavajú vlahu a postupne ju vyparujú do okolitého prostredia. Zvlhčujú lesné ovzdušie a chránia lesnú pôdu pred zvetrávaním a vyparovaním. Zelené časti rastlín (palísky) obsahujú vysoký podiel chloroplastov v bunkách.

Objekt: rastlina machu (*Bryophyta*).

Pomôcky: mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, preparačná ihla, skalpel (alebo žiletka), pinzeta, kvapkadlo.

Postup: Kúsok zelenej časti rastliny machu prenesieme pinzetou do kvapky vody na podložnom sklíčku. Opatrne zakryjeme krycím sklíčkom a pod mikroskopom pozorujeme bunky najskôr pri menšom (10x) a potom väčšom (40x, príp. 100x) zväčšení. V bunkách sa sústredíme na zelené chloroplasty obsahujúce zelené farbivo chlorofyl.

Doba trvania: 15 min.

Výsledok: Zakreslíme a popíšeme objekty, ktoré sme pozorovali pri menšom i väčšom zväčšení v palítku machu. Pri väčšom štastí môžeme pozorovať okrem výraznej bunkovej steny chloroplastov aj jadrá buniek.

Cvičenie č. 2: Pozorovanie rastlinných prieduchov

Teoretický úvod: Prieduch v pokožkových pletivách nadzemných častí rastlín je orgán regulujúci výmenu plynov a vyparovanie vody. Zohráva dôležitú úlohu pri príjme oxidu uhličitého a pri transpirácii, má teda svoju úlohu pri dýchaní (výmene plynov (CO_2 a O_2) medzi rastlinou a prostredím) a fotosyntéze rastlín. Prieduch tvorí dvojica buniek fazuľovitého (obličkovitého) tvaru, medzi ktorými je prieduchová štrbina. Vzácnejšie môžu mať prieduchové bunky kosťovitý tvar (napríklad u tráv z radu *Poales*). Veľkosť štrbiny určuje turgor zatváracích buniek, takže čím viac sú bunky naplnené vodou, tým viac sú od seba oddelené. Prieduchové bunky majú na strane štrbiny zhrubnutú bunkovú stenu. Na rozdiel od buniek pokožky obsahujú aj **chloroplasty**. Prieduchy sa nachádzajú najmä na spodnej strane listov, ale vodné rastliny s plávajúcimi listami na hladine ich majú na vrchnej strane.

Objekt: čerstvý list prhlavy dvojdomej (*Urtica dioica* L.) alebo púpavy lekárskej (*Taraxacum officinale* L.).

Pomôcky: mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, preparačná ihla, skalpel (alebo žiletka), pinzeta, kvapkadlo.

Postup: Z čerstvého listu urobíme pomocou skalpela alebo žiletky veľmi tenký preparát šikmým rezom, pričom sa snažíme zachytiť čo najväčšiu plochu spodnej časti listu. Preparát preniesieme pinzetou do kvapky vody na podložnom sklíčku. Opatrne zakryjeme krycím sklíčkom a pod mikroskopom pozorujeme najskôr pri menšom, aby sme lokalizovali bunky prieduchov. Potom pri väčšom zväčšení detailne pozorujeme prieduchy a hlavne prítomnosť chloroplastov.

Doba trvania: 15 min.

Výsledok: Zakreslíme pozorované štruktúry pri menšom i väčšom zväčšení a popíšeme, čo sme pozorovali. Vysvetlíme lokalizáciu a význam chloroplastov v prieduchoch rastlín.

Cvičenie č. 3: Extrakcia chlorofylu a jeho pozorovanie pod mikroskopom

Teoretický úvod: V listoch zelených rastlín sa nachádza viacero farbív, ktoré sa zúčastňujú procesu fotosyntézy a aj iných procesov regulovaných svetlom. Najznámejším farbivom je zelený **chlorofyl**. Ďalšie farbivá sú napr. deriváty chlorofylov a karotenoidy. Poznáme dva

druhy chlorofylu - *chlorofyl a* a *chlorofyl b*. *Chlorofyl a* sa dá od *chlorofylu b* rozlíšiť na základe spektrálnych vlastností (farby). Karotenoidné farbivá sú odvodené od alfa- a beta-karoténov zavedením molekuly kyslíka. *Beta*-karotén je najpočetnejšie zastúpeným karotenoidom v listoch. Hlavnou úlohou karotenoidov je absorpcia svetla. Karotenoidy absorbujú energiu v modrej oblasti spektra a prenášajú ju na chlorofyly.

Objekt: zelené listy (tráva, byliny, zelené listy zo stromov).

Pomôcky: mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, skalpel alebo žiletka, preparačná ihla, Pasteurove pipety, filtračný papier, stojan, kadičky, filtračný lievik, svorka, kvapkadlo, trecia miska, odmerný valec, skúmavka.

Chemikálie: etanol (C_2H_5OH), uhličitan vápenatý ($CaCO_3$).

Postup: Odvážime si 2 g zelených listov. Do kadičky si nalejeme pomocou odmerného valca 40 ml etanolu. Rastlinný materiál narežeme alebo nastriháme na menšie kúsky a zhomogenizujeme v trecej miske s 0,1 g $CaCO_3$. Obsah v trecej miske zalejeme 15-20 ml etanolu a riadne premiešame, až kým sa nám nevytvorí kašovitá hmota. Zhotovíme si filtračnú aparatúru. Hmotu prefiltrujeme vo filtračnej aparatúre cez skladaný filtračný papier. Nádobu trecej misky opláchneme zvyšným etanolom. Na očistené podložné sklíčko kvapneme kvapku získaného vyextrahovaného chlorofylu a prikryjeme ju opatrne krycím sklíčkom. Pozorujeme pod mikroskopom pri menšom (10x) a postupne väčšom zväčšení (40x až 100x). Do skúmavky si nalejeme približne 5 ml získaného alkoholového roztoku a pozorujeme zafarbenie pri dopade svetla.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Popíšeme postup extrakcie chlorofylu. Pozorujeme získaný roztok pri dopadne svetla. Pod mikroskopom pozorujeme vzniknutý extrakt a zakreslíme a správne popíšeme pozorované štruktúry pri menšom a následne väčšom zväčšení.

Cvičenie č. 4: Delenie roztoku asimilačných farbív

Teoretický úvod: Lipochrómy sú rastlinné farbivá vyskytujúce sa v plastidoch. Patria k nim zelené chlorofyly, žlté xantofyly a červené karotenoidy. Patria medzi asimilačné farbivá a podieľajú sa na biochemickom procese fotosyntézy. V alkohole sa extrahujú spoločne všetky lipochrómové farbivá. Pri chromatografickom delení sa papierovou aj tenkovrstvovou chromatografiou delia na zelené chlorofyly a žlté až oranžové xantofyly.

Objekt: vyextrahovaný chlorofyl (získaný v cvičení č. 3).

Pomôcky: skúmavka so zátkou, odmerný valec alebo pipeta, kvapkadlo.

Chemikálie: benzín (C_6H_{14}).

Postup: V skúmavke zmiešame 6 ml roztoku chlorofylu s 2 ml benzínu a niekoľkými kvapkami vody. Skúmavku zazátkujeme a dôkladne pretrepeme. Sledujeme rozdelenie vrstiev.

Doba trvania: 15 min.

Výsledok: Zakreslíme a popíšeme pozorované vrstvy. Identifikujeme, ktorá vrstva predstavuje ktoré farbivá.

Cvičenie č. 5: Chloroplasty sa menia na chromoplasty

Teoretický úvod: Ruža šípová (*Rosa canina* L.) je asi 3 metre vysoký krík so silne ostnatými vetvami. Šípky kvitnú od apríla do júla. Plody sú červeno sfarbené šípky, obsahujúce súplodie nažiek, ktoré sa nachádza v zdužnatej šešuli. Nažka vzniká z jedného alebo viac plodolistov. Šípky obsahujú vitamín C a okrem čajov z nich je možné robiť víno a marmelády. Pri zrení šípky na jeseň sa chloroplasty menia na chromoplasty. Vymizne chlorofyl a ostávajú len karotenoidy. Navyše sa syntetizujú nové druhy karotenoidov (napr. lykopén, *beta*-karotén) a preto pôvodne zelené šípky sčervenejú. Uvedené karotenoidy sa nachádzajú vo forme kryštálov v tzv. kryštalických chromoplastoch.

Objekt: zelené a červené plody (šípky) ruže šípovej (*Rosa canina* L.).

Pomôcky: mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, preparačná ihla, skalpel (alebo žiletka), pinzeta, kvapkadlo.

Postup: Zo zelenej a červenej bobule šípky odrežeme žiletkou (alebo ostrým skalpelom) tenké priečne rezy, ktoré preparačnou ihlou preniesieme vedľa seba jedným do kvapky vody na podložnom sklíčku. Zhotovíme natívny preparát. Gumou môžeme jemne pritlačiť na krycie sklíčko a pripraviť tak roztlakový preparát.

Doba trvania: 15 min.

Výsledok: Do protokolu zakreslíme alebo odfoťíme pri rovnakom zväčšení (40x) bunku s chloroplastmi zo zelenej bobule a vedľa bunky s ružovo-hnedo sfarbenými chromoplastmi z dozrelej, červenej bobule ruže šípovej. Popíšeme jednotlivé pozorované štruktúry.

Cvičenie č. 6: Chromoplasty v bunkách mrkvy

Teoretický úvod: Karotény sú organické farbivá, ktoré sa rozpúšťajú v lipofilných rozpúšťadlách (v nepolárnych organických rozpúšťadlách ako chloroform, éter, benzén, acetón a pod.) a v tukoch. Sú dôležité ako prekurzory pre syntézu vitamínu A. Nachádzajú sa hojne v koreňoch mrkvy a v plodoch rajčiaka a tiež v malom množstve v chloroplastoch spolu s chlorofylom ako zložky fotosyntetického aparátu rastlín.

Objekt: koreň mrkvy (*Daucus carota* L.) alebo plod rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* L.).

Pomôcky: mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, preparačná ihla, skalpel (alebo žiletka), pinzeta, kvapkadlo.

Postup: Z rastlinnej vzorky pripravíme priečny a pozdĺžny rez (čo najtenší, priesvitný). V kvapke vody pripravíme natívny preparát a pozorujeme.

Doba trvania: 10 min.

Výsledok: Nájdeme typické parenchymatické bunky a v nich drobné oranžové zhluky chromoplastov (sú to kryštalické chromoplasty). Zakreslíme a popíšeme pri najväčšom zväčšení.

Cvičenie č. 7: Prirodzené indikátory pH v rastlinnej bunke

Teoretický úvod: Antokyány sú červené, modré a fialové rastlinné farbivá patriace medzi hydrochrómy, t.j. vo vode rozpustné farbivá. Vyskytujú sa najmä v kvetoch a plodoch, prevažne vo forme heteroglykozidov. *Zriedenými kyselinami* sa tieto glykozidy za *tepla* ľahko hydrolyzujú na sacharidy a na príslušný aglykón zvaný antokyanidín. Farba antokyánových farbív v listoch alebo plodoch závisí od formy, v akej sa v bunke nachádzajú. Antokyány v kyslom prostredí sú *červenej farby*, pri neutrálnom pH sú *fialové* a v alkalicknej oblasti majú *modrú až zelenú farbu*. Zmenu farby antokyánov v závislosti od pH je možné overiť si aj na natívnych kvetoch fialky, plúcnika, muškátov apod., ktoré v parách čpavku modrajú a v parách kyselín červenajú. Farba kvetu plúcnika sa mení aj v prirodzených podmienkach. Hlavný biologicko-ekologický význam antokyánov spočíva v lákaní hmyzu (atraktanti) a v absorpcii slnečného žiarenia. Antokyány sa často akumulujú v listoch aj pri poruchách minerálnej výživy rastlín (červené a hnedé škvrny na listoch pri nedostatku draslíka).

Objekt: červená kapusta (*Brassica oleracea* var. *capitata* Dc.), červená odroda cibule (*Allium cepa* L.), kvet muškátu (*Pelargonium zonale* L.).

Pomôcky: mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, skalpel, preparačná ihla, kadička s destilovanou vodou, Pasteurove pipety, filtračný papier, kvapkadlo.

Chemikálie: 0,1 M vodný roztok kyseliny chlorovodíkovej (HCl), 0,1 M vodný roztok hydroxidu sodného (NaOH).

Postup: Z rastlinných vzoriek pripravíme skalpelom čo najtenšie rezy a preparačnou ihlou ich prenesieme do kvapky vody na podložnom sklíčku. Prikryjeme krycím sklíčkom a sledujeme pod mikroskopom. Nájdeme veľké bunky s veľkou centrálnou vakuolou zafarbenou na *fialovo* prítomnosťou antokyánu. Potom preparát presajeme 0,1 M vodným roztokom NaOH a pozorujeme farebné zmeny v bunkách. Následne presajeme preparát 0,1 M vodným roztokom HCl a znovu zaznamenáme farebné zmeny, ku ktorým v bunkách dochádza. Ak sa nepodarí dosiahnuť dvojakú zmenu farby na jednom preparáte, je vhodné zhotoviť nový preparát na sledovanie vplyvu zmeny pH.

Doba trvania: 20 min.

Výsledok: Popíšeme a fotografiou alebo obrázkom zdokumentujeme zmeny v zafarbení antokyánov v kyslom a zásaditom prostredí.

Kontrolné otázky

1. Ako by ste charakterizovali rastlinné farbivá?
2. Napíšte, čo viete o hydrochrómoch.
3. Čo viete o lipochrómoch?
4. Ako by ste charakterizovali chlorofyly?
5. Čo môžete pozorovať pri zrení šípky?
6. Aké tri vrstvy pozorujete pri rozdelení chlorofylov papierovou chromatografiou?
7. Čo sú karotény?
8. Čo viete o antokyánoch? Kde sa vyskytujú a aký majú prínos pre rastlinu?
9. Čo sú prirodzené indikátory pH v rastlinnej bunke a ako sa ich farba mení v závislosti od pH prostredia?
10. Akými rozpúšťadlami môžete extrahovať farbivá plastidov, ako sú xantofyly, karotény, chlorofyly?

Zaujímavosť

Zelený chlorofyl je zvláštny fenomén. Svojou štruktúrou sa podobá špecifickou zložkou krvi človeka, hemoglobínu, za ktorého typickú farbu je zodpovedné farbivo hem s podobnou štruktúrou ako má chlorofyl. Spolu umožňujú transport dýchacích plynov cievny systémom človeka. Hem obsahuje centrálny atóm železa, ktorý je komplexačne viazaný histidínovými zvyškami, zatiaľ čo chlorofyl obsahuje vo svojej štruktúre centrálnu viazanú horčík v porfyrínovej kostre. Mierne nadnesene by sme mohli tvrdiť, že chlorofyl listov a hem krvi sú z hľadiska chemickej štruktúry dvojčatá. Chlorofyl možno považovať za látku, ktorou príroda umožňuje tvorbu krvi u všetkých bylinožravcov a teda aj u človeka. Je klinicky potvrdené, že podávanie chlorofylu ľuďom trpiacim anémiou napomáha zvyšovať množstvo červených krviniek dokonca efektívnejšie ako podávanie železa, ktoré má aj negatívne vedľajšie účinky. Okrem toho by sme zdraviu prospešné účinky konzumácie chlorofylu na ľudský organizmus mohli zhrnúť nasledovne: stimulácia imunitného systému, regenerácia pokožky pri kožných ochoreniach, odvodnenie organizmu pri zavodnení, eliminácia plesní v organizme, čistenie krvi, čriev a celková detoxikácia pečene i celého organizmu, znižovanie rizika rakoviny a podpora organizmu pri liečbe rakoviny, normalizácia krvného tlaku, znižovanie zápachu v ústach i telesného pachu.

BIOGÉNNÉ PRVKY

Živá hmota (bioplazma) nie je z hľadiska chemického zloženia jednotná, ale skladá sa z mnohých látok, ktoré sa vyskytujú vo forme prvkov a zlúčenín. Bioplazma sa vyznačuje určitým stupňom organizácie a prebiehajú v nej rôzne biochemické procesy. Bioplazma obsahuje asi 60 prvkov z Mendelejevovej periodickej sústavy. Všetky prvky podieľajúce sa na stavbe látok živej prírody sa nazývajú biogénne prvky.

Biogénne prvky sú prvky, ktoré sa vyskytujú v živých systémoch a majú pre tieto systémy nezastupiteľnú úlohu. Podľa množstva, v akom sa vyskytujú v živých organizmoch, sa klasifikujú do dvoch tried:

- i. **makroelementy** (makrobiogénne prvky) – vyšší obsah v živých systémoch; C, H, O, N, P, Ca, Mg, Fe, S, Na a K a
- ii. **mikroelementy** (mikrobiogénne prvky) nízky obsah – Zn, Cu, Ni, Co, Se, Li, Si, I, B a F.

Voda, anorganické a organické látky sú hlavnými zložkami bunky. Až 99 % hmotnosti živej bunky tvoria 4 **biogénne prvky**: C, H, O a N, ďalej P a S. Majoritná časť makroelementov je obsiahnutá v proteínoch, nukleových kyselinách, sacharidoch a lipidoch, ktoré tvoria základnú hmotu bioplazmy. Kvantitatívne zastúpenie jednotlivých zlúčenín nie je vo všetkých bunkách, ale ani štruktúrach rovnaké. Rozdiely závisia od druhovej príslušnosti organizmu, od druhu a veku buniek.

V protoplazme sú biogénne prvky nielen súčasťou organických látok aj anorganických zlúčenín, pričom mnohé z nich môžu byť prítomné vo forme voľných iónov K^+ , Na^+ , Cl^- a Mg^{2+} pôsobiacich ako elektrolyty, ktoré podmieňujú životné procesy, riadia osmotickú činnosť buniek, usmerňujú hodnotu pH a podobne. Napr. ióny Ca^{2+} sú viazané prevažne na organické zlúčeniny, avšak význam majú aj vo forme nerozpustných solí (kosti, zuby, schránky ulitníkov, škrupiny slepačích vajec a pod).

Oligobiogénne prvky tvoria dodnes neuzatvorenú skupinu a patria k nim hlavne ťažké kovy. Zn je viazaný predovšetkým v tých proteínoch, ktoré vykazujú enzymatickú aktivitu. Makrobiotický prvok Fe je vždy viazaný v komplexoch organických zlúčenín a zúčastňuje sa katalýzy oxidačno-redukčných dejov v bunke. Mn sa zúčastňuje prenosu elektrónov pri produkcii kyslíka počas fotosyntézy. Co je súčasťou všadeprítomného vitamínu B_{12} . Mo je súčasťou nitrogenáz a redukuje N_2 na NH_3 . Se je nevyhnutnou súčasťou aminokyseliny selenocysteín.

Z hľadiska **organických látok** sú v bunke najviac zastúpené: sacharidy, tuky, proteíny, nukleové kyseliny.

Cvičenie č. 1: Dôkaz vápnika v bunkách cibule

Teoretický úvod: Vápnik (Ca) patrí k makroelementom. V živých organizmoch sa vyskytuje vo forme komplexných solí (napr. pri živočíchoch ako základ opornej sústavy), alebo ako dvojmocný kation (Ca^{2+}). V živočíšnych organizmoch je vápnikový kation dôležitý pri pohybe

svalov, šírení nervového vzruchu, sekrécii hormónov a zrážaní krvi. V rastlinách spevňuje bunkové steny a udržiava stabilnú hodnotu pH v cytoplazme. Viaže sa na proteín kalmodulín, ktorú aktivuje a prostredníctvom nej sa zúčastňuje na prenose signálov z prostredia do jadra buniek.

Cibuľa kuchynská je veľmi vhodný objekt na mikroskopické pozorovanie vzhľadom ku svojej štruktúre a jemným vrstvám pokožky. Dôkaz vápnika uskutočníme pomocou kyseliny sírovej, ktorá reaguje so šťavelanom vápenatým za vzniku síranu vápenatého, pričom je možné pozorovať zmenu obdĺžnikových kryštálov šťavelanu vápenatého na typické ihlicovité kryštáliky síranu vápenatého.

Objekt: vonkajšia odumretá pokožka cibule kuchynskej.

Pomôcky: mikroskop, podložné sklíčko, krycie sklíčko, preparačná ihla, skalpel a pinzeta, nožnice, Pasteurova pipeta, filtračný papier.

Chemikálie: 10 % roztok (v/v) kyseliny sírovej (H_2SO_4).

Postup: Vonkajšiu odumretú pokožku cibule (epidermu) rozrežeme na malé (5 mm x 5 mm) štvorčeky. Štvorček preniesieme na podložné sklíčko do kvapky vody, prikryjeme opatrne krycím sklíčkom a pozorujeme. Pozorovaný obraz zakreslíme do protokolu. Roztok kyseliny sírovej pridávame k preparátu tzv. presávacou metódou (str. 37 – 38). Pozorujeme pri malom zväčšení (10x) a tiež pri zväčšení 40x počas nasledujúcich 10 – 15 min. Pozorovaný obraz opäť zakreslíme.

Doba trvania cvičenia: 15 - 20 min.

Výsledok: V preparáte s vodou pozorujeme tvar a štruktúru buniek epidermy cibule. Zakreslíme alebo odfotíme pozorovaný objekt pri menšom i väčšom zväčšení. Zdokumentujeme zmenu vnútorného prostredia bunky spôsobenú prítomnosťou kyseliny sírovej. Vysvetlíme dôkaz vápnika v bunke.

Kontrolné otázky

1. Čo je to bioplazma?
2. Definujte pojem „biogénne prvky“.
3. V akej forme sa v živých organizmoch vyskytuje vápnik a akú má funkciu?
4. Uvedte princíp metódy na dôkaz vápnika v bunkách cibule.
5. Aká je štruktúra síranu vápenatého v rastlinnej bunke?
6. Charakterizujte stručne mikroelementy a vymenujte aspoň päť zástupcov z tejto skupiny prvkov.
7. Charakterizujte stručne makroprvky a vymenujte aspoň päť zástupcov z tejto skupiny prvkov.
8. Vymenujte štyri skupiny látok tvoriace organické látky.
9. Ako by ste charakterizovali oligobiogénne prvky?
10. Aký je význam Mn a Co v organizme?

Zaujímavosť

Organická chémia sa zaoberá štúdiom zlúčením uhlíka. Organické zlúčeniny boli kedysi považované za látky, ktoré sa vyskytujú iba v živých organizmoch, ale neskôr bola táto teória (vitalizmus) vyvrátená, keď sa chemikom podarilo syntetizovať organické zlúčeniny aj v laboratórnych podmienkach z anorganických zlúčenín. Schopnosť uhlíka vytvárať štyri kovalentné väzby prispieva k jeho schopnosti podieľať sa na vzniku rozmanitých molekúl. Uhlík sa môže viazať s veľkým množstvom atómov vrátane O, H a N, taktiež s ďalšími atómami uhlíka, čím vzniká uhlíkatá kostra organických zlúčenín. Chemickou modifikáciou uhlíka sú napríklad dve látky diametrálne odlišnými fyzikálnymi vlastnosťami – grafit a diamant.

BUNKA A PROSTREDIE

Difúzia je všeobecný jav, ktorý sa pozoruje v plynch, kvapalinách, ale aj v tuhých látkach. Ak sa napríklad zmiešajú dve kvapaliny (napr. alkohol a voda), prenikajú (difundujú) molekuly jednej látky medzi molekuly druhej látky, kým sa nevytvorí rovnovážny stav, v ktorom sú molekuly oboch kvapalín rovnomerne rozptýlené v danom objeme.

Osmóza je prenikanie rozpúšťadla do roztoku oddeleného od neho polopriepustnou (semipermeabilnou) membránou, ktorá prepúšťa iba molekuly rozpúšťadla, ale nie molekuly rozpustených látok. Tlak, ktorému musíme roztok vystaviť, aby sa zamedzilo prenikaniu rozpúšťadla (napríklad vody) do neho, sa nazýva **osmotický tlak**. Je to teda tlak potrebný na zabránenie osmózy.

Vakuolizovaná bunka a vonkajší roztok, ktorým je bunka obklopená, tvorí prirodzený systém, v ktorom prebieha osmóza. Osmotická hodnota bunky je daná koncentráciou osmoticky aktívnych látok v bunke, pri rastlinách najmä vo vakuole. Ak je osmotický tlak vakuolového roztoku menší (hypotonický roztok) než osmotický tlak okolitého roztoku (hypertonický roztok), tak dochádza k osmóze vody z vakuoly cez tonoplast a z cytoplazmy do vonkajšieho prostredia cez semipermeabilnú cytoplazmatickú membránu. Vakuola (a súčasne s ním aj bunka) sa zmenšuje, scvrkáva, až nakoniec sa cytoplazmatická membrána oddelí od bunkovej steny – dochádza k plazmolýze. Naopak, v hypotonickom roztoku bunka vodu nasáva cez cytoplazmatickú membránu a tonoplast do vakuoly a vakuola sa zväčšuje a objem bunky sa mení. Elastická bunková stena sa rozťahuje tak dlho, kým jej spätný tlak (tlak bunkovej steny, turgorový tlak) nedosiahne hodnotu osmotického potenciálu roztoku. Dochádza k deplazmolýze a navráteniu sa bunky do pôvodného (hydratovaného) stavu.

Osmóza je prenikanie rozpúšťadla do roztoku oddeleného od neho polopriepustnou (semipermeabilnou) membránou, ktorá prepúšťa iba molekuly rozpúšťadla, ale nie molekuly rozpustených látok. Osmotickými javmi nazývame zmeny v bunkách odohrávajúce sa vplyvom rozdielnej koncentrácie látok v bunke a prostredí. Tlak, ktorému musíme roztok vystaviť, aby sa zamedzilo prenikaniu rozpúšťadla (napríklad vody) do neho cez semipermeabilnú membránu označujeme ako osmotický tlak. Hodnoty osmotického tlaku buniek sú pomerne vysoké, obyčajne 5 - 10 atm (0,5 - 1,0 MPa, 1 atm = 101,3 kPa). Bunky halofilných (slanomilných) rastlín dosahujú až 100 - 200 atm. Vysokú osmotickú hodnotu podmieňuje vysoká koncentrácia solí vo vakuole. Roztok, ktorý má nižší osmotický tlak (a vyšší osmotický potenciál), než je v bunke (ktorá sa v takomto roztoku nachádza) je hypotonický. Naopak, roztok s vyšším osmotickým tlakom (a nižším osmotickým potenciálom), než je v bunke, ktorá sa v takomto roztoku nachádza, sa nazýva hypertonický.

Plazmolýza je úkaz, pri ktorom sa protoplazma živej bunky oddeľuje od bunkovej steny a scvrkáva sa. Zapríčiňuje ju únik vody z bunky do (hypertonického) prostredia pri osmóze. Roztok vyvolávajúci plazmolýzu sa nazýva plazmolytikum. O **deplazmolýze** hovoríme vtedy, ak sa plazmolyzovaná bunka vloží do hypotonického roztoku, z ktorého bunka osmoticky prijíma vodu, kým v nej nenastane rovnovážny stav. Plazmoptýza je roztrhnutie bunkových stien po vysokom osmotickom napínaní bunkového obsahu. K plazmoptýze dochádza napr.

pri praskaní ovocia v daždivom lete, alebo pri umiestnení morských rias do destilovanej vody: morské riasy sú prispôsobené morskej vode, ktorá má vysoký obsah solí, v destilovanej vode ich bunkové steny nevydržia zvýšený turgor a praskajú.

Osmotické vlastnosti bunky sú pre život rastlín veľmi dôležité, pretože majú podstatný podiel na príjme živín z pôdy a vody. Niektoré životné prejavy sú výsledkom zmien osmotických pomerov v bunkách a pletivách, napr. otváranie a zatváranie prieduchov, pohyby orgánov, klíčenie semien ai. Osmóza je dôležitá aj pre živočíšne a mikrobiálne bunky.

Cvičenie č. 1: Plazmolýza a deplazmolýza buniek

Teoretický úvod: Plazmolýza je osmotický jav, ktorý spočíva v osmotickej strate vody z rastlinnej bunky, ktorá sa nachádza v hypertonickom roztoku (čiže roztoku s väčším osmotickým potenciálom ako vakuoly danej bunky). V takomto hypertonickom prostredí má bunka tendenciu vyrovať koncentráciu, a tak sa voda z bunky dostáva do prostredia, čiže bunka je vysušovaná. Keď živú bunku ponoríme do hypertonického roztoku, preniká voda cytoplazmatickou membránou von a bunka znižuje svoj objem (plazmolýza). Ak plazmolizovanú bunku ponoríme do hypotonického roztoku, alebo čistej vody, vniká voda do bunky, ktorá zväčšuje svoj objem a nadobúda svoj pôvodný objem a tvar (deplazmolýza).

Objekt: vnútorná pokožka cibule kuchynskej (*Allium cepa* L.).

Pomôcky: skalpel, pinzeta, podložné sklíčko, krycie sklíčko, preparačná ihla, Pasteurova pipeta, kadička s destilovanou vodou, 2 M vodný roztok NaCl.

Postup: Pripravíme si preparát cibule. Z vnútornej pokožky cibule pomocou skalpelu a pinzety nakrájame štvorčeky veľkosti približne 5 x 5 mm. Jeden štvorček preniesieme preparačnou ihlou do kvapky vody, druhý do kvapky 2 M vodného roztoku NaCl. Pri preparáte v 2 M vodnom roztoku NaCl pozorujeme priebeh plazmolýzy a po ustálení zakreslíme. Následne plazmolytikum nahradíme vodou (presávacou technikou) a pozorujeme návrat buniek do pôvodného stavu – deplazmolýzu.

Doba: 15 min.

Výsledok: Popíšte podľa obrázka javy, ktoré pozorujeme v bunke v kvapke vody a po pridaní 2 M roztoku NaCl. Vysvetlite, za akých okolností v bunke dochádza k plazmolýze a za akých k deplazmolýze.

Cvičenie č. 2: Výpočet osmotickej hodnoty buniek

Teoretický princíp: Osmotická hodnota buniek sa dá orientačne zistiť použitím metódy hraničnej plazmolýzy, t.j. určením koncentrácie (napr.) NaCl, keď sa cytoplazmatická

membrána práve začína oddeľovať od bunkovej steny. Pre zistenú koncentráciu NaCl potom vyhľadáme v tabuľkách prepočítanú osmotickú hodnotu bunky. Metódou hraničnej plazmolýzy nezistíme absolútnu hodnotu osmotických tlakov v bunkách pletív. Výsledky sú ovplyvnené napúčavosťou cytoplazmy, pružnosťou bunkovej steny, tlakom susedných buniek a podobne. Preto pri rastlinných bunkách nehovoríme o osmotickom tlaku, ale o osmotickej hodnote. Koncentrácia NaCl, pri ktorej zistíme tzv. hraničnú plazmolýzu, zodpovedá približnej osmotickej hodnote bunky. Táto je daná koncentráciou osmoticky účinných látok v bunke (prevažne vo vakuole). O hraničnej plazmolýze hovoríme vtedy, keď sa cytoplazmatická membrána práve začne oddeľovať od bunkovej steny. Viditeľná býva obzvlášť v rohoch buniek. Osmotickú hodnotu bunky môžeme približne vypočítať podľa vzorca: $P = (R.T.c.i.) / V$

kde P je hľadaný osmotický tlak v MPa, R je plynová konštanta ($R = 0,082$), T je absolútna teplota ($T = 273 +$ teplota laboratória), c je koncentrácia rozpustenej látky v móloch, i je izotonický koeficient (pre NaCl $i = 1,5$) a V je objem, v ktorom je rozpustená jedna molekula plazmolytika pri hraničnej koncentrácii (napr. ak plazmolýza prebieha pri koncentrácii 0,25 M, potom $V = 1/0,25 = 4!$)

Objekt: vnútorná pokožka cibule kuchynskej (*Allium cepa* L.).

Pomôcky: skalpel, pinzeta, podložné sklíčko, krycie sklíčko, preparačná ihla, Pasteurova pipeta, kadička s destilovanou vodou, 2 M roztok NaCl, skúmavky, pipety delené (2 ml, 5 ml), mikroskop.

Postup: Najprv si pripravíme rad odstupňovaných koncentrácií NaCl podľa Tabuľky 2. Potom si pripravíme preparáty cibule. Z vnútornej pokožky cibule pomocou skalpelu a pinzety nakrájame štvorčeky veľkosti približne 5 x 5 mm. Narezané kúsky pokožky preniesieme do označených skúmaviek s odstupňovanými koncentraciami roztoku chloridu sodného. Dbáme o to, aby štvorčeky z pokožky cibule boli úplne ponorené do plazmolytika a skúmavky uzavrieme kovovými vrchnákmi. Za 5 - 10 min prezeráme každý kúsok pokožky pod mikroskopom vždy v danom roztoku (začínáme od najvyššej koncentrácie). Zistíme, pri akej koncentrácii NaCl prebieha hraničná plazmolýza a vypočítame osmotickú hodnotu bunky.

Tabuľka 2: Koncentrácie roztoku NaCl a spôsoby prípravy jednotlivých koncentrácií ako aj ich osmotická hodnota pre výpočet osmotickej hodnoty bunky.

Koncentrácia roztoku NaCl (M)	Zás. roztok 2M NaCl (cm ³ = ml)	Destilovaná voda (cm ³ = ml)	Osmotická hodnota roztoku NaCl (MPa, pri 27°C)
0,2	0,50	4,50	0,839
0,3	0,75	4,25	1,248
0,4	1,00	4,00	1,657
0,5	1,25	3,75	2,066
0,6	1,50	3,50	2,566
0,7	1,75	3,25	2,965
0,8	2,00	3,00	3,374

Doba: 35 - 45 min.

Výsledok: Zaznamenáme mikroskopické pozorovania jednotlivých preparátov a podľa výsledkov vypočítame osmotickú hodnotu bunky.

Cvičenie č. 3: Porovnanie semipermeability membrán živých a mŕtvych buniek

Teoretický princíp: Živá bunka má semipermeabilnú (čiastočne priepustnú) cytoplazmatickú membránu. Prijíma vodu a chráni bunkový obsah proti vonkajšiemu okoliu. Po usmrtení bunky (napr. pri vysokej teplote, pôsobením agresívnych chemických látok, ako sú silné kyseliny, zásady a organické rozpúšťadlá), sa stráca jej semipermeabilita a obsah vakuoly sa vylieva do prostredia.

Objekt: koreň repy obyčajnej cviklovej (*Beta vulgaris* var. *vulgaris*).

Pomôcky: nôž, kadičky, varič.

Chemikálie: destilovaná voda, chloroform, 30 % roztok kyseliny octovej.

Postup: Z koreňa očistenej repy cviklovej si pripravíme kocky veľkosti cca 0,5 x 0,5 x 0,5 cm. Kocky premyjeme v tečúcej vode. Premyté kocky cvikly (12 ks) vložíme do vody s laboratórnou teplotou (3 ks), vriacej vody (3 ks), roztoku kyseliny octovej (3 ks) a chloroformu (3 ks). Pozorujeme reakcie.

Doba: 15 min.

Výsledok: Popíšeme reakcie vzoriek, ktoré sme pozorovali v jednotlivých kadičkách. Vysvetlíme pozorované javy.

Cvičenie č. 4: Pozorovanie bunky v osmoticky rôzne aktívnych prostrediach

Objekt: mrkva, zemiak, list tradeskancie (*Tradescantia*).

Pomôcky: žiletka, malá lyžička, skalpel, pinzeta, nôž, kadičky, mikroskop, podložné a krycie sklíčka.

Chemikálie: NaCl, pšeničná múka, destilovaná voda, fyziologický roztok, nasýtený roztok NaCl.

Postup:

a) Do mrkvy vydlabeme pomocou malej lyžičky, prípadne skalpelom dve jamky. Jednu naplníme soľou a druhú pšeničnou múkou. Pozorujeme.

- b) Očistíme zemiak od vonkajšej šupky. Nožikom z obieleného zemiaka vyrežeme 3 úplne zhodné hranolčeky. Všetky tri označíme a odvážime. Hmotnosti si zapíšeme. Jeden hranolček vložíme do kadičky s destilovanou vodou, druhý do kadičky s fyziologickým roztokom a tretí do kadičky s nasýteným roztokom NaCl. V roztokoch necháme hranolčeky približne 20 min. Po tomto čase ich vytiahneme z roztokov, mierne osušíme krátkym položením na filtračný papier a odvážime. Hmotnosti si zapíšeme a porovnáme s hmotnosťami nameranými na začiatku úlohy, pred vložením hranolčekov do roztokov.
- c) Pomocou žiletky získame z listu tradeskancie preparát pokožky. Pod mikroskopom pozorujeme prieduchy. Presávacou technikou pridáme k preparátu destilovanú vodu a pozorujeme.

Doba: 30 min.

Výsledok: Popíšeme zmeny, ktoré pozorujeme v jednotlivých pozorovaných objektoch. Porovnáme rozdiely v nameraných hmotnostiach a vyvodíme závery (cvičenie b). Popíšeme, aké zmeny pozorujeme v prieduchoch (cvičenie c). Vysvetlíme, ktoré prostredia sú pre rastlinné bunky osmoticky aktívne a ako sa toto prostredie prejavuje na rastlinnej bunke a na jej orgánoch.

Kontrolné otázky

1. Uvedte, čo je difúzia.
2. Definujte pojem osmóza?
3. Kedy dochádza ku:
 - a) plazmolýze,
 - b) deplazmolýze,
 - c) plazmoptýze.
4. Aký je to osmotický tlak?
5. Kedy je roztok hypotonický?
6. Kedy je roztok hypertonický?
7. Kedy dochádza k hraničnej plazmolýze a pri čom sa tento jav využíva?
8. Aké prostredie predstavuje múka, soľ a škrob pre bunky hľuzy zemiakovej?
9. Čo je to semipermeabilita?
10. Definujte pojem deplazmolýza?

Zaujímavosť

Voda je látka umožňujúca život. Všetky živé organizmy sú vytvorené z veľkej časti z vody a žijú v prostredí, ktorému voda dominuje. Voda je na Zemi biologickým médiom a je možné, že je to tak obdobne aj na iných planétach. Život na Zemi sa začal vyvíjať pred 4,5 miliardami rokov vo vode a postupne prešiel na pevninu. Moderný život, dokonca aj suchozemský (terestrický) zostáva však stále s vodou úzko spojený. Väčšina buniek je obklopená vodou a samotné bunky sú vodou tvorené zo 70 – 95 %. Voda sa rozprestiera na 3/5 zemského

povrchu. Voda sa na zemskom povrchu nachádza väčšinou v kvapalnej forme, zastúpená je však aj vo forme ľadu a vodnej pary. Voda je jedinou látkou, ktorá existuje prirodzene vo všetkých troch skupenstvách – pevnom, kvapalnom a plynnom. Nadbytok vody je hlavnou príčinou, že Zem je obývateľná. Darwinova teória akceptuje, že život sa pomocou prírodného výberu prispôbil svojmu životnému prostrediu, avšak Lawrence Henderson vo svojej knihe, Udržanie životného prostredia (The Fitness of the Environment), zdôrazňuje, že aby život mohol vôbec existovať, musí byť preň životné prostredie najskôr vyhovujúcim miestom. A práve voda je kľúčový element, ktorý prispieva k udržaniu života na Zemi.

RASTLINNÉ PLETIVÁ

Jednou z hlavných vlastností buniek mnohobunkového organizmu je ich schopnosť diferencovať sa, t. j. štrukturálne i funkčne sa prispôbiť potrebám organizmu ako celku. Diferenciácia nastáva v určitom období života buniek a prebieha postupne v mnohých generáciách. V individuálnom vývine organizmu sa z pôvodne nešpecializovaných embryonálnych buniek postupne diferencujú bunky a pletivá určené na rozličné funkcie.

V priebehu diferenciácie nastávajú rôzne metabolické zmeny, ktorých výsledkom sú rozdiely v morfológických, chemických a fyziologických vlastnostiach buniek. Tieto rozdiely sa v rôznom stupni vyskytujú nielen v rozlíšení buniek rôznych orgánov, ale aj medzi bunkami a pletivami toho istého orgánu. Najmä pri rastlinách sa často na tom istom orgáne dajú pozorovať rôzne prechody od súborov buniek nešpecializovaných až po pletivá vysoko diferencované.

Pletivo je definované ako súbor buniek rastlinných organizmov, ktoré sa diferencovali a špecializovali na vykonávanie určitých funkcií. Vzniká postupným delením buniek, ktoré sú od seba oddelené bunkovými stenami. Štúdium pletív sa zaoberá rastlinná histológia.

Bunky pletiva medzi sebou komunikujú **plazmodezmami**. Je to bunkový kanál na mikroskopickej úrovni a rastlina ho využíva na komunikáciu a transport látok medzi jednotlivými bunkami. Plazmodezma sa skladá z troch vrstiev: cytoplazmatickej membrány, rukávu plazmy (tzv. *cytoplasmic sleeve*) a desmotubulu (trubice endoplazmatického retikula).

Základné typy pletív:

(1) Podľa schopnosti deliť sa

- **DELIVÉ** (meristémy): Ich bunky sú schopné deliť sa → umožňujú rast rastliny. Nachádzajú sa v rastových vrcholoch (vrchol koreňa, stonky, listov). Poznáme primárny meristém (vo vegetačných vrcholoch koreňa, listov a stonky) a sekundárny meristém (vzniká obnovením delivej schopnosti trvácich pletív – kambium a felogén, ktoré sú v druhotne
- **TRVÁCE**: Vznikli činnosťou delivých buniek. Sú tvorené diferencovanými bunkami, ktoré stratili schopnosť deliť sa

(2) Podľa zhrubnutia bunkovej steny

- **PARENCHYMATICKÉ**: Tvorené tenkostennými bunkami s veľkými medzibunkovými priestormi (interceluláry). Vypĺňajú vnútorné orgány. Napr. palisádový parenchým v listoch, mezenchým v mladých častiach rastliny
- **KOLENCHYMATICKÉ**: Tvorené nerovnomerne zhrubnutými bunkovými stenami (najčastejšie v rohoch). Hlavne v stopkách plodov (zhrubnutie dodáva pevnosť → mechanická funkcia)
- **SKLERENCHYMATICKÉ**: Rovnomerne silne zhrubnuté bunkové steny, ktoré sú prestúpené plazmodezmami. Ich bunky sa nazývajú sklereidy (kamenné bunky), lebo sú tvrdé a zdrevnatené. Vyskytujú sa napr. v dužine hrušky, v kôstke marhuli atď.

(3) Podľa funkcie

- **KRYCIE:** Pokrývajú povrch tela, chránia ho (pred mechanickým poškodením, vyparovaním nadmerného množstva vody, nepriaznivými vonkajšími vplyvmi) a umožňujú výmenu látok s vonkajším prostredím. Sú tvorené z:
 - i. **POKOŽKY:** jedna vrstva buniek, ktoré sú blízko seba, ich tvar a zloženie závisí od typu rastliny, napr. trávy ich majú inkrustované oxidom kremičitým. V nadzemných častiach rastliny sa volá EPIDERMA, v podzemných častiach rastliny sa volá RIZODERMA. Na povrchu epidermy je kutikula, ktorá tvorí súvislú vrstvu, obsahuje nepriepustný kutín, ktorý bráni vysušeniu.
 - ii. **CHLPY (TRICHÓMY):** vyrastajú z pokožky. Môžu byť krycie (na povrchu listov), žľaznaté (muškát), prhlivé (prhláva), absorpčné (prijímajú vodu a v nej rozpustné látky – napr. koreňový vlások)
 - iii. **EMERGENCIE:** krycie (ostne) – chránia pred byľinožravcami (napr. ruža, egreš), alebo žľaznaté (tentakuly) – lepkavé žľazky mäsožravých rastlín, na ktoré sa prilepí hmyz .
 - iv. **PRIEDUCHY:** zabezpečujú výmenu plynov a vyparovanie vody medzi rastlinou a prostredím, sú vo všetkých mladých častiach zelených rastlín, sú tvorené dvoma obličkovými bunkami, ktoré majú schopnosť otvárať a zatvárať sa a medzi ktorými je dýchacia štrbina.
 - v. **HYDATÓDY:** sú prieduchy, ktoré stratili schopnosť otvárať a zatvárať sa. Vždy sú otvorené.
 - vi. **KOROK:** je druhotné krycie pletivo, vytvára sa u zdrevnatených stoniek činnosťou felogénu. Je tepelný a mechanický izolátor. U niektorých rastlín jeho vonkajšie vrstvy praskajú, odlupujú sa a tvoria borku.
- **VODIVÉ:** Umožňujú transport vody a v nej rozpustených látok. Sú tvorené súborom cievnych zväzkov, ktoré tvorí lyko a drevo.
 - i. **DREVO = XYLÉM:** vedie vodu a v nej rozpustené minerály = anorganické látky z koreňa k listom = **TRANSPIRAČNÝ PRÚD.** Tvoria ho cievy (mŕtve rúrky s rozpadnutými priečnymi priehradkami) a cievice (mŕtve bunky so zachovanými priečnymi priehradkami, ktoré sú prederavené).
 - ii. **LYKO = FLOÉM:** vedie organické látky získané fotosyntézou z listov do orgánov alebo na dlhodobé uskladnenie. Tvoria ho sitkovice (živé bunky, medzi ktorými sú priehradky).
- **ZÁKLADNÉ:** Tvoria priestor medzi vodivými a krycími pletivami. Majú rôzne funkcie, tvoria ich hlavne parenchymatické bunky:
 - i. **ASIMILAČNÉ:** obsahujú veľa chlorofylu → fotosyntéza → v listoch
 - ii. **MECHANICKÉ:** chráni cievne zväzky, hlavne kolenchým a sklerenchým
 - iii. **ZÁSOBNÉ:** obsahujú OL (T, C, B), sú v koreňoch, podzemkoch, hľuzách atď.
 - iv. **VYLUČOVACIE:** mliečnice, ktoré slžia mlieko (latex) alebo nektária, ktoré vylučujú nektár (sacharidová aromatická látka) a lákajú tak opelovačov.

Cvičenie č. 1: Pozorovanie pokožky listu

Teoretický úvod: Pokožka predstavuje krycie pletivo vzniknuté z primárneho *meristému*. Je tvorená v rastlinách zvyčajne jednou vrstvou plochých buniek bez medzibunkových priestorov. Pri rastlinách rastúcich na suchých stanovištiach sa nachádza na vonkajšej strane buniek zhrubnutá bunková stena pokrytá kutínom. Vytvára súvislú vrstvu nazývanú *kutikula*. Pokožku rastlín tvorí zvyčajne jedna vrstva pokožkových buniek, ktoré neobsahujú chlorofyl. Medzi nimi sú roztrúsené prieduchy tvorené dvojicou zatváracích buniek obličkovitého tvaru. Medzi oboma bunkami je dýchacia štrbina. Prieduch je tvorený dvomi bunkami najčastejšie obličkovitého tvaru, ktoré obsahujú chlorofyl. Funkciou prieduchov je regulovať množstvo vody v rastline a zabezpečiť výmenu dýchacích plynov i vody. Prieduchové bunky sa diferencujú pri raste listu, od ostatných pokožkových buniek sa nelíšia len veľkosťou a tvarom, ale aj tým, že majú vyšší počet chloroplastov a na pohľad sú zelenšie ako ostatné bunky preparátu.

Objekt: čerstvý list muškátu.

Pomôcky: žiletka, mikroskop, podložné a krycie sklíčko, preparačná ihla, pinzeta.

Postup: List priečne narežeme pozdĺžnym smerom žiletkou. Narezaný tenký kúsok pokožky listu pelargónie položíme na podložné sklíčko do kvapky vody a zhotovíme preparát. Pozorujeme pod mikroskopom pri rôznych zväčšeniach.

Doba trvania: 15 min.

Výsledok: Zakreslíme alebo odfotíme jednotlivé štruktúry a typy buniek pozorované v rastlinnom listovom preparáte pri menšom (10-40x) a väčšom (100x) zväčšení. Popíšeme pozorované štruktúry a ich význam pre rastlinný organizmus.

Cvičenie č. 2: Pletivá v listovej stopke muškátu

Teoretický úvod: Listová stopka je tvorená bunkami rôzneho tvaru a veľkosti. Na okraji je vrstva pokožkových buniek, z ktorých môžu pri rôznych druhoch rastlín vyrastať trichómy. Najčastejšie sa vyskytujú v rastlinných stopkách dva druhy trichómov – krycie (zahrotené) a žľaznaté (hlavičkovito zakončené). Pod pokožkou smerom do stredu je viacbunková vrstva kôry, sklerenchymatická pošva tvorená menšími hrubostennými bunkami a stržňové parenchymatické pletivo vytvárané veľkými tenkostennými bunkami. Na sklerenchymatickú pošvu priliehajú v určitých vzdialenostiach cieвне zväzky. Medzi bunkami pozorujeme rozdiely nielen v ich morfológii, ale aj v chemickej skladbe a v prítomnosti rôznych bunkových organel. Bunky vnútorných vrstiev listovej stonky obsahujú škrobové zrná ako zdroj energie a farbja sa Lugolovým roztokom do modro-fialova. Bunky kôry a stržňa obsahujú celulózu, ktorá sa prejavuje modrým zafarbením v prítomnosti kyseliny sírovej.

Objekt: čerstvý list muškátu (*Pelargonium zonale* L.).

Pomôcky: žiletka, malý štetec, Lugolov roztok, H₂SO₄, podložné a krycie sklíčko, preparačná ihla, pinzeta, mikroskop, kvapkadlo.

Postup: Žiletkou narežeme sériu priečných rezov listovej stopky a vlhkým štetom ich prenesieme do väčšej kvapky vody na podložnom sklíčku. Pripravíme aj sériu pozdĺžnych rezov, ktoré uložíme na podložné sklíčko do kvapky vody. Prikryjeme krycím sklíčkom a pozorujeme pod mikroskopom. Presávacou technikou presajeme Lugolovým roztokom a pozorujeme pod opäť mikroskopom. Znova použijeme presávaciu techniku roztokom H₂SO₄ a pozorujeme pod mikroskopom.

Doba: 20 min.

Výsledok: Zakreslíme jednotlivé pozorované vrstvy buniek v listovej stonke rastliny. Popíšeme pozorované morfológické rozdiely medzi bunkami ako aj rozdiely v prítomnosti bunkových organel a chemických zložiek. Vysvetlíme, ako jednotlivé typy buniek reagujú v prítomnosti Lugolovho roztoku a kyseliny sírovej.

Cvičenie č. 3: Pozorovanie koreňa na pozdĺžnom a priečnom reze

Teoretický úvod: Na priečnom reze koreňom môžeme pozorovať tri sústavy pletív. Na obvode je pokožka (krycie pletivo), pod ňou je prvotná kôra a uprostred je centrálny valec, v ktorom je uložený zväzok cievny (vodivé pletivo). Na pozdĺžnom reze koreňovým vrcholom vidíme niekoľko odlišných typov pletív. Na konci koreňového vrcholčeka je pôvodný meristém, ktorý tvoria malé izodiametrické bunky s tenkou bunkovou stenou, tieto bunky sú ešte nediferencované. Nad nimi sa začínajú rozlišovať tri súbory primárneho meristému: dermatogén, z ktorého sa diferencuje pokožka, periblém, z ktorého vznikne kôra a plerom, z ktorého sa vyvinú vodivé pletivá (cievne zväzky). Koniec koreňového vrcholu je pokrytý koreňovou čiapočkou. Je tvorený pokožkou bez prieduchov a kutikuly.

Objekt: koreň cibule kuchynskej.

Pomôcky: mikroskop, žiletka, malý štetec, podložné a krycie sklíčko, preparačná ihla, pinzeta, kvapkadlo.

Postup: Žiletkou narežeme sériu priečných rezov koreňa cibule. Najtenší rez prenesieme do kvapky vody na podložnom sklíčku, prikryjeme krycím sklíčkom a pozorujeme pri menšom (10-40x) a väčšom (100x) zväčšení. Taký istý postup opakujeme pri realizovaní pozdĺžnych rezov koreňa cibule.

Doba: 20 - 30 min.

Výsledok: Zakreslíme a popíšeme jednotlivé vrstvy buniek, ktoré pozorujeme pri priečnom a pozdĺžnom reze rastlinného koreňa. Vysvetlíme význam jednotlivých vrstiev buniek v životnom cykle rastliny.

Cvičenie č. 4: Pozorovanie parenchymatického pletiva zo stržňa bazy čiernej

Teoretický úvod: Trváce pletivá podľa hrúbky bunkovej steny rozdeľujeme na parenchymatické, kolenchymatické a sklerenchymatické. Parenchým je tvorený bunkami približne rovnakých rozmerov, medzi bunkami sa nachádzajú početné medzibunkové priestory. Parenchymatické pletivo sa nachádza v každej časti rastliny.

Objekt: stržeň bazy čiernej.

Pomôcky: mikroskop, žiletka, malý štetec, podložné a krycie sklíčko, preparačná ihla, pinzeta.

Chemikálie: chlórzinkjód.

Postup: Uskutočníme niekoľko priečných rezov z valcovitého stržňa bazy. Rezy preniesieme do kvapky chlórzinkjódu na podložnom sklíčku. Pripravený preparát pozorujeme.

Doba: 15 min.

Výsledok: Zakreslíme a popíšeme parenchymatické pletivo, ktoré pozorujeme pod mikroskopom. Vysvetlíme význam tohto druhu pletiva v rastlinnom organizme.

Cvičenie č. 5: Pozorovanie kolenchýmu zo stonky uhorky

Teoretický úvod: Bunky kolenchýmu majú na hranách zhrubnuté bunkové steny. Tento typ pletiva sa nachádza práve v tých častiach rastliny, ktoré sú namáhané ťahom, či otáčaním. Dodáva rastline potrebnú pružnosť a pevnosť. Sklerenchým sa skladá z odumretých buniek, ktorých bunkové steny sú rovnomerne zhrubnuté, majú takmer rovnaké rozmery ako bodky. Sklerenchymatické bunky sú prestúpené kanálikmi, umožňujúcimi vzájomné spojenie susedných buniek plazmodermami. Sklerenchým predstavuje spevňovacie pletivo, vyskytuje sa najmä v kôstkach, pošvách, ale i v dužine plodov.

Objekt: stonka uhorky.

Pomôcky: mikroskop, podložné a krycie sklíčko, pinzeta, žiletka, malý štetec, pipeta.

Postup: Z okrajových častí stonky uhorky urobíme niekoľko priečných rezov. Zhotovíme preparát v kvapke vody, ktorý pozorujeme.

Doba: 15 min.

Výsledok: Zakreslíme a popíšeme kolenchymatické pletivo, ktoré pozorujeme pod mikroskopom. Vysvetlíme význam tohto druhu pletiva v rastlinnom organizme.

Cvičenie č. 6: Pozorovanie sklerenchymatického pletiva zo škrupiny orecha

Teoretický úvod: Sklerenchým sa skladá z odumretých buniek, ktorých bunkové steny sú rovnomerne zhrubnuté. Sklerenchymatické bunky sú prestúpené kanálikmi, ktoré sa nazývajú plazmodezmy a tie umožňujú komunikáciu medzi bunkami a vzájomné spojenie rastlinných buniek. Sklerenchým predstavuje spevňovacie pletivo. Vyskytuje sa najmä v kôstkach, pošvách, ale i v dužine niektorých plodov.

Objekt: škrupina orecha vlašského (*Juglans regia* L.).

Pomôcky: mikroskop, podložné a krycie sklíčka, pinzeta, žiletka, malý štetec, pipeta.

Chemikálie: glycerol.

Postup: Škrupinu orecha varíme asi hodinu vo vode, potom ju na týždeň vložíme do glycerolu, aby zmäkla. Takto ľahšie zrežeme žiletkou tenkú vrstvičku škrupiny, ktorú použijeme na prípravu preparátu. Mikroskopické pozorovanie zakreslíme a popíšeme.

Doba: 15 min. (príprava vzorky 1 týždeň).

Výsledok: Zakreslíme a popíšeme sklerenchymatické pletivo, ktoré pozorujeme pod mikroskopom. Vysvetlíme význam tohto druhu pletiva v rastlinnom organizme.

Cvičenie č. 7: Pozorovanie pokožkových buniek listov mikroreliefovou metódou

Teoretický úvod: Pokožkové pletivá zaraďujeme medzi krycie pletivá. Bunky pokožky sú bez medzibunkových priestorov a tesne k sebe priliehajú. Úlohou krycích pletív je chrániť rastlinu (pred mechanickým poškodením, nepriaznivými vplyvmi prostredia a pred vysušením) a sprostredkovať výmenu látok. Prieduchy pozorované v pokožke monofaciálneho listu a v spodnej pokožke bifaciálneho listu umožňujú výmenu plynov medzi rastlinou a vonkajším prostredím. Tvoria ich dve zatváracie bunky a dýchacia medzera uložená medzi bunkami.

Objekt: list ľubovoľnej rastliny.

Pomôcky: žiletka, malý štetec, mikroskop, krycie a podložné sklíčka, preparačná ihla, pinzeta, priesvitný lak na nechty, priesvitná lepiaca páska.

Postup: Zo spodnej a vrchnej strany listu nanesieme tenkú vrstvu bezfarebného laku na nechty. Dbáme na to, aby vrstva laku dobre zaschla (minimálne 5 min), v opačnom prípade

nezískame dokonalý odtlačok pokožky, ale môžeme stiahnuť aj časť rastlinných pletív. Po zaschnutí laku prelepíme túto časť listu lepiacou páskou, ktorú opatrne stiahneme. Voľnými koncami lepiacej pásky prilepíme získaný odtlačok na podložné sklíčko. Takto pripravený preparát pozorujeme pod mikroskopom. Okrem pokožkových buniek pozorujeme aj tvar a rozmiestnenie prieduchov.

Doba: 20 min.

Výsledok: Zakreslíme a popíšeme pozorované pletivá a štruktúry. Vysvetlíme ich význam v rastlinnom organizme.

Cvičenie č. 8: Anatomická stavba listu jedno- a dvojkličnolistových rastlín

Teoretický úvod: List patrí medzi vegetatívne rastlinné orgány. Jeho funkciou je fotosyntetická asimilácia, transpirácia a dýchanie. Z hľadiska vonkajšej stavby rozlišujeme listovú čepeľ a stopku, u jednokličnolistových rastlín sa vyskytujú i prílistky. Na listovej čepeľi dvojkličnolistových rastlín rozlišujeme rub a líce. Anatomickú stavbu takého listu preto tvorí vrchná pokožka, palisádový parenchým, špongiový parenchým a spodná pokožka s prieduchmi. Kolaterálne alebo bikolaterálne cievne zväzky sú v mezofyle listu. Rozlíšený listový mezofyl má dve základné funkcie: fotosyntézu (palisádový parenchým, obsahujúci chloroplasty) a dýchanie (špongiový-hubovitý parenchým s veľkými medzibunkovými priestormi). Listy jednokličnolistových rastlín sú monofaciálne, rub a líce sa na nich nerozlišuje. Anatomickú stavbu listu predstavuje vrchná pokožka s prieduchmi, nerozlíšený mezofyl, v ktorom sú umiestnené cievne zväzky a spodná pokožka s prieduchmi.

Objekt: list trávy alebo obilniny (jednokličnolistová rastlina) a dvojkličnolistovej rastliny (napr. fikus, púpava a podobne).

Pomôcky: mikroskop, podložné a krycie sklíčka, pinzeta, žiletka, malý štetec, pipeta.

Postup: List oboch typov rastlín opláchneme vodou a urobíme niekoľko jemných priečných rezov. Najtenší rez z každého typu rastliny prenesieme do kvapky vody na podložnom sklíčku vedľa seba a pripravíme mikroskopický preparát. Pozorujeme pod mikroskopom najskôr pri malom a potom pri najväčšom zväčšení.

Doba: 20 min.

Výsledok: Zakreslíme a popíšeme pozorované pletivá a štruktúry. Popíšeme rozdiely v anatómii medzi jednokličnolistovými a dvojkličnolistovými rastlinami.

Kontrolné otázky

1. Vysvetlite pojem diferenciacia mnohobunkového organizmu.
2. Definujte plazmodezmy a na čo slúžia.

3. Čo je výsledkom metabolických zmien nastávajúcich v priebehu diferenciácie?
4. Definujte pojem pletivo.
5. Ako delíme pletivá podľa schopnosti deliť sa? Popíšte krátko každú skupinu.
6. Ako by ste rozdelili pletivá podľa zhrubnutia bunkovej steny?
7. Uveďte rozdiel medzi prieduchom a hydratódou.
8. Aký je to transpiračný prúd a kde k nemu dochádza?
9. Čím sú tvorené prieduchy a aká je ich funkcia?
10. Aké sústavy pletív môžete pozorovať pri priečnom reze koreňom?

Zaujímavosť

Koreňová špička je podľa niektorých odborníkov porovnateľná s mozgom nižších živočíchov. Je to akási riadiaca centrála, obzvlášť citlivé miesto v rastlinnom organizme. Koreňové bunky sú sensoricky i elektricky veľmi aktívne. Aj čo sa pohybu týka, sú oveľa aktívnejšie ako stonka. Najcitlivejšie vnímajú informáciu a dávajú impulz bazálnym motorickým častiam rastliny, aby zareagovali, ohnú sa. Koreňová špička má dve ohybné zóny, ktoré spolu koordinujú svoje aktivity. Táto koordinácia koreňom umožňuje aktívny pohyb, ktorý pripomína pohyb červov a hadov. Vďaka svojej aktivite korene vyhľadávajú v pôde miesta bohaté na vodu a minerálne látky a naopak, miestam suchým a toxickým sa vyhýbajú. Okrem toho sú koreňové špičky hlboko v pôde a tak sú chránené pred nepriaznivými podmienkami prostredia. Prvý, kto si činnosť koreňov všimol, bol Charles Darwin. V roku 1880 vydal spolu so svojim synom Francisom knihu *The Power of Movement in Plants* (O schopnosti pohybu rastlín). V tom čase kniha vzbudila polemiky medzi profesormi botaniky a mnohí si mysleli, že Darwin stratil na staré kolená rozum. Dnes však vedci citlivejšími metódami výskumu a vďaka moderným prístrojom zisťujú, že bunky v koreňovej špičke rastliny fungujú veľmi podobne ako neuróny v mozgu živočíchov. Koreň pod zemou vplyvom pohybu mení svoj tvar a smer a rýchlosť pohybu prispôsobuje vonkajším podmienkam prostredia. Ako dôsledok vnútropletivových pnutí a trenia koreňa s pôdou koreň dokonca vydáva zvuk. Niektorí vedci sa domnievajú, že koreň má schopnosť echolokácie, podobne ako majú netopiere. Je predpoklad, že okrem iných mechanizmov, aj z ozveny by koreň mohol zisťovať povahu terénu, aby vedel, kadiaľ rásť.

ŽIVOČÍŠNE TKANIVÁ

Živočíšna bunka je eukaryotická. Podľa funkcie a lokalizácie má rôzny tvar a veľkosť. Veľkosť môže byť od niekoľko mikrometrov až po centimetre. Povrch živočíšnej bunky tvorí cytoplazmatická membrána, ktorá ohraničuje bunku. Je polopriepustná (semipermeabilná), reguluje príjem a výdaj látok do bunky a z bunky. Vnútro bunky vyplňa cytoplazma. Živočíšna bunka obsahuje **membránové štruktúry** (bunkové jadro, jadierko, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, ribozómy, Golgiho aparát a lyzozómy), **fibrilárne štruktúry** (mikrofilamenty a mikrotubuly) a **neživé súčasti bunky**, kam patria bunkové inklúzie, rezervné látky (glykogén, tuky) a neústrojné látky vo forme kryštálikov. Živočíšna bunka neobsahuje pevnú bunkovú stenu, chloroplasty ani vakuoly. Výnimkou sú bunky jednobunkových organizmov, ktoré vakuoly majú napr. pulzujúca vakuola. Spojenia medzi bunkami sú veľmi tesné a nazývajú sa **desmozómy**. Pomocou nich bunky medzi sebou komunikujú a zabezpečujú výmenu látok.

Tkanivá sú súbory buniek a medzibunkovej hmoty rovnakého pôvodu, tvaru a približne rovnakej funkcie. Vzájomnú výmenu látok medzi bunkami sprostredkúva tkanivový mok v medzibunkových priestoroch. Tkanivá funkčne a tvarovo špecializované sa zoskupujú do orgánov, orgánových sústav a tie tvoria organizmus.

Epitelové tkanivá (výstelky) vystielajú vnútorný a vonkajší povrch orgánov. Obsahujú len malé množstvo medzibunkovej hmoty. Nemajú vlastné cievne zásobovanie a bunky sú vyživované hlbšie uloženými tkanivami. Patrí sem krycí epitel – kryje vonkajší a vnútorný povrch (napr. pokožka), resorpčný (vstrebávací) epitel, ktorý tvoria bunky schopné prijímať látky a odovzdávať ich do ďalších tkanív a orgánov (napr. klky tenkého čreva), zmyslový epitel, ktorý obsahuje bunky schopné reagovať na rozličné druhy podnetov a meniť ich na nervový vzruch (napr. čuchové, chuťové, zrakové, sluchové bunky), žľazový epitel obsahujúci bunky špecializované na sekréciu (napr. v žľazách s vnútornou sekréciou) a obrvený epitel obsahujúci bunky schopné pohybu (napr. výstelka priedušnice, vajíčkovody).

Spojivové (podporné) tkanivá (spojivá) vyplňajú priestory medzi orgánmi, spájajú ich, izolujú alebo tvoria oporu mäkkým častiam tela. Obsahujú veľké medzibunkové priestory vyplnené medzibunkovou hmotou, ktorá je produktom tohto typu tkanív. Spojivové tkanivá môžu byť **výplňové a oporné, trofické, svalové, nervové a pigmentový epitel**. Výplňové a oporné spojivá obsahujú bunky nazývané fibrocyty a veľké množstvo medzibunkovej hmoty, ktorá je zložená z kolagénových (dodávajú pevnosť a odolnosť voči ťahu) a elastických vlákien (dodávajú pružnosť). Tento typ tkaniva vyplňa priestory medzi orgánmi, tvorí šľachy a puzdrá orgánov. Trofické tkanivá sú tvorené krvnými bunkami a lymfatickými. Svalové tkanivo tvoria pohybové vlákna svalových buniek (myofibrily), v ktorých rozoznávame 2 typy proteínových vlákien: aktín a myozín. Sú schopné kontrakcie a pohybu. Nervové tkanivo tvoria nervové bunky (neuróny) a gliové bunky, ktoré zabezpečujú výživu

neurónov. Funkciou nervového tkaniva je dráždivosť (vytvorenie nervového vzruchu) a vodivosť (prenášanie nervového vzruchu). Pigmentový epitel obsahuje pigment a jeho úlohou je absorbovať žiarenie. Je tvorený rôznymi typmi buniek a u bezstavovcov je jednovrstvový. U stavovcov je viacradový a viacvrstvový a jeho hlavným reprezentantom je pokožka. Prechodný epitel je prispôsobený na rozťahovanie a naťahovanie (napr. urotel v močovom mechúri).

Cvičenie č. 1: Pozorovanie trvalých preparátov živočíšnych tkanív

Objekt: trvalé preparáty živočíšnych tkanív.

Pomôcky: mikroskop.

Postup: Vyberieme si trvalé preparáty rôznych živočíšnych buniek a tkanív. Pozorujeme ich pod mikroskopom najskôr pri malom zväčšení a postupne pri väčšom. Sledujeme typy buniek, prítomnosť rôznych štruktúr v bunkách a medzibunkové priestory a rozdiely medzi jednotlivými typmi tkanív.

Doba: 15 min.

Výsledok: Zakreslíme alebo odfotíme jednotlivé pozorované preparáty. Vysvetlíme význam pozorovaných tkanív v živočíšnom organizme a rozdiely medzi nimi.

Cvičenie č. 2: Mikroskopické pozorovanie ľudských epitelových buniek

Objekt: epitelové bunky zo sliznice ústnej dutiny.

Pomôcky: pipeta, podložné a krycie sklíčko, lyžička, pinzeta, preparačná ihla, pipeta, strička s destilovanou vodou.

Chemikálie: Lugolov roztok (metylénová modrá).

Postup: Okrajom čistej lyžičky prejdeme veľmi opatrne po vlastnom mäkkom podnebí. Nepatrné množstvo povlaku preniesieme do kvapky vody na podložnom sklíčku. Prikryjeme krycím sklíčkom. Pozorujeme preparát. Presávacou technikou presajeme preparát Lugolovým roztokom a opäť pozorujeme.

Doba: 15 - 20 min.

Výsledok: Zakreslíme alebo odfotíme pozorované epitelové bunky v kvapke vody pred a po pôsobení Lugolovho roztoku. Popíšeme jednotlivé pozorované štruktúry.

Cvičenie č. 3: Mikroskopické pozorovanie črievičky končistej

Teoretický úvod: Črievička končistá patrí medzi jednobunkové organizmy (kmeň nálevníky, *Ciliophora*). Má zložitú štruktúru. Na povrchu bunky sa nachádza tenká pevná pelikula, z ktorej vyrastajú brvy slúžiace na pohyb. Črievička má vyvinuté orgány na prijímanie a spracovanie potravy: bunkové ústa, z ktorých prechádza potrava do bunkového hltana, potom do tráviacej (potravovej) vakuoly a po spracovaní prijatých látok sa odpadové látky vylučujú bunkovým ánosom do vonkajšieho okolia. Na osmoreguláciu má vyvinuté pulzujúce (stiahnuteľné) vakuoly, ktorými črievička vylučuje prebytočnú vodu i odpadové látky. Má vyvinutý jadrový dimorfizmus, veľké jadro je makronukleus a riadi metabolizmus bunky. Mikronukleus (menšie jadro) je nositeľom genetickej informácie a riadi pohlavné rozmnožovanie (konjugáciu). Črievička končistá (*Paramecium caudatum*) sa vyskytuje v stojatých sladkých vodách s organickými odpadmi a je indikátor ich znečistenia.

Objekt: senný nálev.

Pomôcky: mikroskop, pipeta, podložné a krycie sklíčko, pinzeta, preparačná ihla.

Postup: Pripravíme si týždeň vopred senný nálev. Do sklenej nádoby dáme vrstvu sena a zalejeme ju vodou z vodovodu. Nádobu necháme prikrytú stáť na svetlom mieste. Na očistené podložné sklíčko kvapneme kvapku senného nálevu, prikryjeme krycím sklíčkom a pozorujeme pod mikroskopom najskôr pri menšom zväčšení (10-40x) a následne pri väčšom zväčšení (100x). Pozorujeme jednotlivé orgány pozorovaného organizmu, ako aj telo organizmu. Rýchly pohyb črievičiek obmedzíme tým, že do kvapky senného nálevu pridáme chumáčik vaty alebo kúsok papierovej utierky.

Doba: 15 min. (príprava preparátu 1 týždeň).

Výsledok: Zakreslíme alebo odfotíme stavbu tela črievičky a pri detailnom zväčšení zakreslíme a popíšeme jednotlivé pozorované orgány bunkového tela.

Cvičenie č. 4: Pozorovanie orgánov dážďovky zemnej

Teoretický úvod: Dážďovka zemná (alebo obyčajná) je obrúčkavec z čeľade dážďovkovité. Je to stredne veľký červ žijúci v pôde. Dorastá do dĺžky približne 9 až 30 cm. Telo má svalovitého tvaru. Svaly sú tvorené dvoma vrstvami, priečnych a pozdĺžnych. Napnutím priečneho svalstva sa pohne dopredu predná časť jej tela. Vyvolané sťahy svaloviny prejdú celým telom a umožnia tak pohyb zadnej časti. Potom pozdĺžne svaly posunú chvostové časti. Hlien, ktorý vylučujú jej žľazy, jej zjednodušuje dýchanie a pohyb po nerovnom povrchu a zabraňuje vysychaniu kože. Taktiež môžeme pozorovať jemné ochlpenie jej tela, redukované štetiny napomáhajú pohybu a tiež majú ochrannú funkciu. V prednej časti tela má hmatový prstík, ktorý jej slúži k ľahšej orientácii. Clitellum (opasok) je u väčšiny druhov výrazné po celý život. Oči im chýbajú, v koži sú však rozptýlené fotoreceptorové bunky. Majú 1 – 2 páry gonád, ich uloženie v určitých somitoch je dôležitým systematickým znakom.

V telovej dutine môžeme pozorovať jednoduchú rebríčkovitú nervovú sústavu, tráviaci a cievny systém, ktoré kopírujú článkovanie tela.

Objekt: dážďovka zemná (*Lumbricus terrestris* L.).

Pomôcky: filtračný papier, skalpel, preparačné špendlíky, podložka na preparovanie, mikroskop, podložné a krycie sklíčko, pinzeta, preparačná ihla.

Postup: Najskôr umiestnime živú dážďovku na filtračný papier a pozorujeme jej pohyb. všimame si jemný šušťivý zvuk, ktorý nasvedčuje prítomnosti jemných štetín na povrchu tela. Sledujeme aj tvorbu hlienu. Následne dážďovku preniesieme na podložku a pozdĺžnym rezom skalpelom prerežeme telo. Jemne ho pootvoríme a pomocou preparačných špendlíkov prichytíme pootvorené okraje. Pozorujeme vnútornú anatómiu tela dážďovky. Vybrané štruktúry preniesieme pomocou preparačnej ihly do kvapky vody na podložnom sklíčku a po prikrytí krycím sklíčkom pozorujeme pod mikroskopom najskôr pri menšom a následne väčšom zväčšení.

Doba: 30 min.

Výsledok: Zapišeme, čo pozorujeme voľným okom pri pohybe dážďovky na filtračnom papieri. Sústredíme sa na spôsob pohybu, zvuk a tvorbu hlienu. Zakreslíme alebo odfoťíme stavbu tela dážďovky a jednotlivé typy tkanív pozorovaných pod mikroskopom.

Kontrolné otázky

1. Popíšte orgány vyskytujúce sa v živočíšnej bunke.
2. Popíšte rozdiely medzi rastlinnou a živočíšnou bunkou.
3. Charakterizujte význam epitelových tkanív a vymenujte aspoň tri typy týchto tkanív.
4. Vymenujte všetkých päť typov spojivových tkanív.
5. Čo sú to desmozómy?
6. Čo tvorí nervové tkanivá a aký je ich význam v živočíšnom organizme?
7. Čo viete o črievičke končitej?
8. Ako by ste popísali stavbu tela dážďovky zemnej?
9. Čo viete o štruktúre molekuly DNA?
10. Popíšte v skratke postup na extrakciu DNA zo živočíšnej vzorky.

Zaujímavosť

Medzi živočíšnymi bunkami existujú nielen tvarové, ale aj veľkostné rozdiely. Veľkosť guľovitých buniek môže byť v rozmedzí 0,15 μm (najmenšie baktérie) až po pštosie vajce, ktorého rozmer je 75 000 μm (75 mm). Pre porovnanie, ľudské vajíčko má v priemere 250 μm a slepačie 35 000 μm . Medzi najmenšie bunky patria sinice a baktérie guľovitého tvaru. Dĺžka medzi najmenšou a najväčšou bunkou je v pomere 1:5000 tisícim a objem v pomere

1:125 biliardám. Veľkosť buniek je spôsobená množstvom zásobných látok, ktoré obsahujú. Pozoruhodný je aj rozdiel medzi samčou (spermia) a samičou (vajcová bunka) pohlavnou bunkou človeka. Objem medzi nimi je v pomere 1:1 miliónu. Vajcová bunka (vajíčko) má približne guľový tvar a s priemerom 120 μm je tesne na hranici viditeľnosti voľným ľudským okom. Červené krvinky patria k najmenším bunkám ľudského tela. Majú priemer 8 μm a neobsahujú ako jedny z mála eukaryotických buniek jadro. Do jedného milimetra sa zmestí viac ako 100 červených buniek (erytrocytov). Pre porovnanie, oproti červenej krvinke je ľudské vajíčko asi tak veľké ako veľryba v porovnaní s človekom. Kožné bunky ľudského organizmu sú väčšie, majú bežne 30 μm . Najdlhšie bunky v ľudskom tele sú neuróny. Môžu dosahovať dĺžku aj viac ako meter. Na druhej strane, sú veľmi tenké a ich hrúbka je približne 10 μm . V živočíšnej ríši sa ale nájdu bunky, ktoré sú ešte výrazne väčšie. Napríklad neuróny sépií môžu mať priemer až 1 mm, čo nachádza uplatnenie vo vede a umožňuje uskutočňovať významné pokroky v skúmaní nervových buniek.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Balcar, B.: Tajemství života, 1. vydanie, Praha : Advent-Orion, 1994, ISBN 80-7172-074-7.

Bína J. a kolektív: Malá encyklopédia chémie, 3. vydanie, Bratislava : Obzor.

Bolton, M.D.: Primary metabolism and plant defense – fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22: 487-497.

Campbell, N.A., Reece, J.B.: *Biologie (český preklad)*, 1. vydanie, Brno : Computer Press, 2006, ISBN 80-251-1178-4.

Erdelský, K., Frič, F.: *Praktikum a analytické metódy vo fyziológii rastlín*, 1. vydanie, Bratislava : SPN Bratislava, 1979, ISBN 978-1-4020-6351-0.

Ferruzzi, M.G., Blakeslee, J.: Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 2007, 27:1-12.

Heidcamp, W. H.: *Cell Biology Laboratory Manual*. 3. vydanie, Saint Peter, Minnesota, USA : Gustavus Adolphus College, 2008, ISBN: 0805302468.

Helms, D.R., Helms, C.W., Kosinski, R.J., Cummings, J.R.: *Biology in the laboratory*. 3. vydanie, New York : W.H. Freeman Custom Publishing, 1998, ISBN-13: 978-0716731467.

Horáková, K., Hudecová, D., Jantová, S., Nádaská, M.: *Biológia. Návodý na cvičenia*. 1. vydanie, Bratislava : Vydavateľstvo STU v Bratislave, 1996, ISBN 80-227-0888-7.

Hudák, J., Dvořák, M., Herichová, A., Lux, A., Nátr, L., Peterková, I.: *Biológia rastlín*, 1. vydanie, Bratislava : SPN Bratislava, 1991, ISBN 80-08-01598-5.

Huikari, O.: *Zázračné stromy*, 1. vydanie, Praha : Dokořán, s.r.o., ISBN 978-80-7363-906-8.

İnanç A.L.: Chlorophyll: Structural properties, health benefits and its occurrence in virgin olive oils. *Akademik Gıda*, 2011, 9(2): 26-32.

Lehotay, J.: *Separáčné metódy v analytickej chémii*. 1. vydanie, Bratislava : STU Bratislava, 2009, ISBN 978-80-227-3036-5.

Paveleková, I.: *Analytická chémia pre študentov pedagogických fakúlt*. 1. vydanie, Trnava : TU Trnava, 2010, ISBN 978-1-4020-6351-0.

Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol.: *Fyziologie rostlin*. 1. vydanie, Praha : Academia Praha, 1998, ISBN 80-200-0586-2.

Pendarvis, M.P., Crawley, J.L.: *Exploring Biology in the Laboratory*. 3. vydanie, Englewood, CO : Morton Publishing Company, 2018, ISBN 1617317551.

Laboratórne cvičenia z biológie I.

Rosypal, S. a kol.: Přehled biologie, 1. vydanie, Praha : SPN, 1987, SPN 6-43-11/1.

Rosypal, S. a kol.: Nový přehled biologie. 1. vydanie, Praha : Scientia Praha, 2003, ISBN 978-80-86960-23-4.

Vodopich, D.S, Moore, R.: Biology – Laboratory Manual. 9. vydanie, McGraw-Hill Companies, Inc. : North Texas, USA, 2011, ISBN 0-07-746252-1.

PRÍLOHA – Vzor protokolu Laboratórných cvičení z biológie I

Katedra biotechnológií	Laboratórne cvičenia z biológie I.	Vypracoval(a): <i>(meno a priezvisko)</i>
Fakulta prírodných vied	Laboratórny protokol č.: <i>(vyplniť číslo protokolu)</i>	Dátum: <i>(deň.mesiac.rok odovzdania protokolu)</i>
Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave	Názov laboratórneho cvičenia: <i>(napísať názov cvičenia)</i>	
Akademický rok: <i>(vyplniť roky, napr. 2018/2019)</i>		

Dôležité upozornenie: Text celého protokolu píšeme v Times New Roman, číslo písma 5. V prípade tabuliek a legendy pod obrázkom je možné použiť číslo písma 10 alebo 11.

Zadanie: Napísať presné zadanie laboratórneho cvičenia podľa podkladov vyučujúceho.

Úloha: Napísať presný názov úlohy podľa študijného materiálu.

Teoretický princíp: Stručná teória ku každej úlohe podľa študijného materiálu (rozsiahlejšie ako jednou vetou), aby bolo jasné podľa teoretického úvodu, o čo ide v danej úlohe. Ak majú úlohy spoločnú teóriu, spoločný princíp, stačí napísať jeden teoretický princíp. Nepatrí sem postup práce, zadanie ani pozorovanie. Teoretický princíp vám má pomôcť tiež pri písaní pozorovania, takže sa netreba zbytočne rozpisovať, ale písať k veci.

Pomôcky: Čo všetko ste pri danej úlohe potrebovali, použili – presne popísať a špecifikovať laboratórne sklo, plasty, použitie vodného kúpeľa a podobne. Popísať aj presne objekt, ktorý bol v úlohe použitý.

Chemikálie: Popísať presne názov a koncentráciu použitých chemikálií.

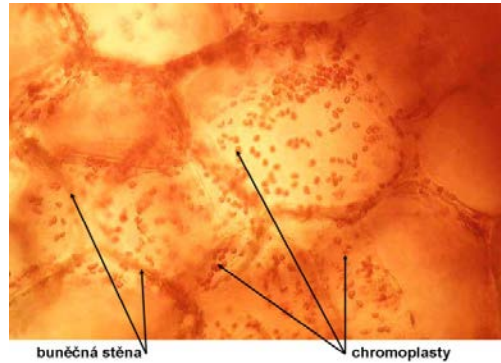
Postup: Stručne, v bodoch alebo odrážkach (1., 2., ...) zachytiť základné kroky, ako bol realizovaný experiment od prípravy vzorky až po získanie výsledku. Pozorovanie a teória sem nepatria.

Pozorovanie a diskusia: Pozorovanie opisuje len to, čo sledujete, vidíte, pozorujete. Žiadna teória ani postup do tejto časti protokolu nepatria. Do pozorovania sa zahŕňajú obrázky (odkazy na obrázky, čo je na nich, ako pozorovaný objekt vyzerá, príp. ako mal vyzeráť a prečo vám to nevyšlo ako malo...).

Obrázky: Každý obrázok musí byť popísaný (názov obrázku sa píše dole pod obrázok) a zároveň musí byť spomenutý v texte pozorovania a diskusie. V prípade, že je potrebné alebo možné na niečo poukázať v obr., tak šípkami doplniť ako je to na vzorovom obrázku nižšie. Vždy keď sa jedná o obrázok získaný pomocou mikroskopu, je dôležité napísať, pri akom zväčšení bol obrázok získaný. V prípade, že použijete obrázok z internetu, je potrebné uviesť aj zdroj, buď priamo k popisu alebo na konci protokolu v zozname použitej literatúry.

Ak protokol obsahuje tabuľku, číslovanie tabuľky a jej nadpis je nad tabuľkou (Např. Tab. 1.: Koncentrácie roztokov použitých na stanovenie osmotického tlaku bunky).

Diskusia obsahuje vlastné myšlienky, pozorovania, čo by sa mohlo zmeniť, inak vypracovať, prečo nám experiment nevyšiel alebo vyšiel. Je vhodné jednoducho diskutovať o danej téme, realizovanej laboratórnej práci. Diskusia môže obsahovať aj Vaše vlastné myšlienky, nápady k téme a stanoviská. Tiež môže obsahovať porovnanie Vašich získaných výsledkov s literárnymi údajmi. Táto časť nie je povinná.



Obr. 1 Chromoplasty v bunkách plodu papriky ročnej (zväčšenie 100x)

Záver: Záver by mal byť stručný, nie je vhodné, aby ste sa rozpisovali. Nepísať sem pozorovanie ani postup. Len stručne zhodnotiť laboratórnu prácu (napr. Oboznámila som sa s mikroskopom a s prácou s ním. Alebo: Osvojila som si základy mikroskopovania, ktoré využijem v nasledujúcich cvičeniach.).

Poznámka: Keď si niekto zoberie do rúk váš protokol, musí vedieť podľa teórie porozumieť, čomu sa venujete v práci (aký je princíp, aký má laboratórna práca význam), podľa vášho postupu musí vedieť, ako má postupovať, keby chcel robiť niečo podobné, podľa pozorovania vidieť, čo ste sledovali, pozorovali (napr. farebné zmeny), na čo si má dať pozor, ako experiment uskutočniť, prípadne sa podľa Vašich komentárov vyhnúť chybám. Z protokolu je pre čitateľa potrebné pochopiť, aký je význam obrázkov, ktoré v texte máte a čo obrázky presne znamenajú. Po formálnej stránke je potrebné, aby celý text bol písaný precízne, bez formálnych a gramatických chýb a preklepov. V celom texte je potrebné použiť rovnakú formu, tj. použiť prvú osobu množného čísla v minulom čase (pripravili sme, použili sme, navážili sme...).

LABORATÓRNE CVIČENIA Z BIOLÓGIE I

Autorský kolektív:

RNDr. Michaela Havrlentová, PhD. (UCM, AH)

RNDr. Daniela Chmelová, PhD. (UCM, AH)

Mgr. Michaela Piliarová, PhD. (UCM, AH)

Recenzenti:

doc. RNDr. Miroslav Ondrejovič, PhD.

doc. Ing. Jozef Fejér, PhD.

Vydavateľ: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, 2020

Vydanie: prvé

Počet strán: 115

ISBN 978-80-8105-943-8