

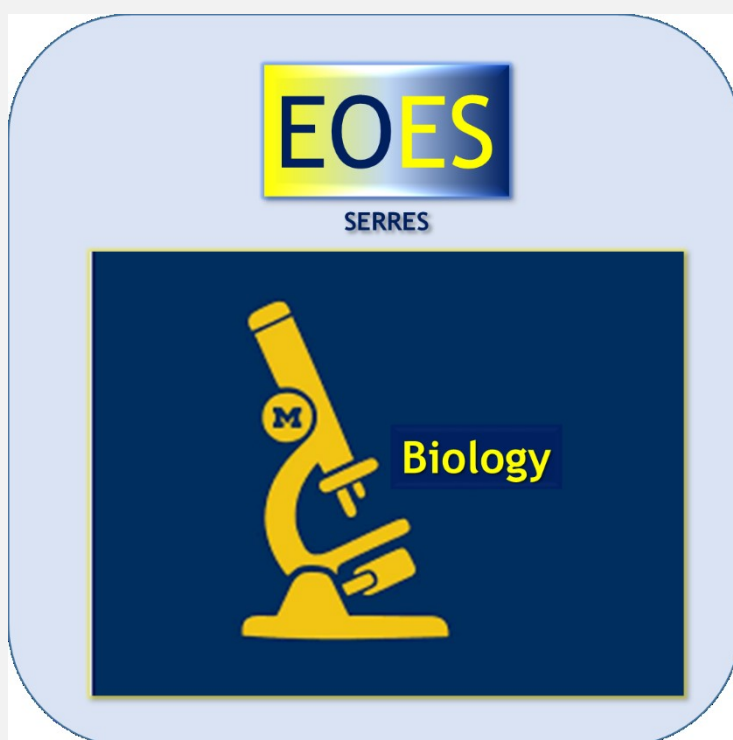
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΣΕΡΡΩΝ

Ευρωπαϊκή Ολυμπιάδα

Πειραμάτων Φυσικών Επιστημών - ΕΟΕΣ 2023

ΤΟΠΙΚΟΣ ΜΑΘΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΓΩΝΙΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΣΧΟΛΕΙΟ:.....

Μαθητές/τριες που συμμετέχουν:

(1).....

(2).....

(3).....

Σέρρες 17/12/2022

Σύνολο μορίων:.....

Παραγωγή βιοκαυσίμων για την αντιμετώπιση της περιβαλλοντικής και ενεργειακής κρίσης

Στόχοι

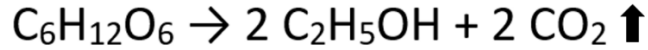
- Παρατήρηση κυττάρων ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* στο μικροσκόπιο
- Προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης των κυττάρων ζύμης
- Παρακολούθηση της παραγωγής των προϊόντων αλκοολικής ζύμωσης

Θεωρητικό μέρος

Το ενδιαφέρον για την βιοενέργεια έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια λόγω της εξάντλησης των αποθεμάτων πετρελαίου καθώς και της περιβαλλοντικής υποβάθμισης που προκύπτει από την υπερκατανάλωση προϊόντων που προέρχονται από πετρέλαιο η οποία απειλεί τη βιωσιμότητα της ανθρώπινης κοινωνίας. Η αρνητική επίδραση των ορυκτών καυσίμων στο περιβάλλον, ιδιαίτερα η εκπομπή αερίων του θερμοκηπίου (όπως του CO₂), έχει στρέψει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας σε εναλλακτικές λύσεις καυσίμων.

Τα βιοκαύσιμα, δηλαδή τα καύσιμα που παράγονται από βιομάζα που προέρχεται κυρίως από φυτά και καλλιέργειες, αποτελούν μία ανανεώσιμη πηγή ενέργειας, φιλική προς το περιβάλλον, που μειώνει το φαινόμενο του θερμοκηπίου καθώς η καύση τους παράγει λιγότερα αέρια του θερμοκηπίου (πχ CO₂) κ.α. Η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) ήδη από το 2018 με την έκδοση της Οδηγίας Ανανεώσιμης Ενέργειας έθεσε σε εφαρμογή μέτρα προώθησης των βιοκαυσίμων στα πλαίσια της Ευρωπαϊκής Πράσινης Συμφωνίας και της επίτευξης μιας κλιματικά ουδέτερης ΕΕ μέχρι το 2050. Παράλληλα, η χρήση τους προσφέρει και μία βιώσιμη εναλλακτική στην ενεργειακή κρίση που βιώνει σήμερα η ΕΕ.

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα βιοκαύσιμα είναι η βιοαιθανόλη και το βιοντίζελ. Η βιοαιθανόλη παράγεται από την αναερόβια αλκοολική ζύμωση σακχάρων με τη βοήθεια μικροοργανισμών όπως των ζαχαρομυκήτων. Στην αλκοολική ζύμωση η διαδικασία ξεκινά από ένα μόριο σακχάρου με 6 άτομα άνθρακα (γλυκόζη) και καταλήγει σε δύο μόρια αλκοόλης με 2 άτομα άνθρακα (αιθανόλη) και δύο μόρια CO₂. Ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος ζυμομύκητας για την παραγωγή βιοαιθανόλης σε βιομηχανικό επίπεδο, αν και η αιθανόλη παράγεται από μια σειρά από άλλες ζύμες, βακτήρια, και μύκητες. Οι πρώτες ύλες παραγωγής βιοαιθανόλης περιλαμβάνουν καλαμπόκι, σιτάρι, ζάχαρη (ζαχαρότευτλα) και άλλα δημητριακά όπως κριθάρι και σίκαλη τα οποία είναι πλούσια σε σάκχαρα. Η μετατροπή της γλυκόζης σε αιθανόλη περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση:



Γλυκόζη

Βιοαιθανόλη

Διοξείδιο του άνθρακα

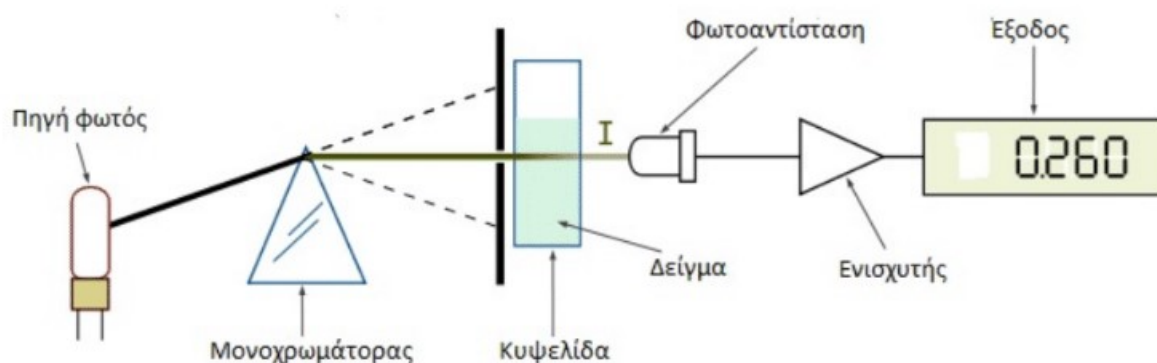
Ο προσδιορισμός της ανάπτυξης των κυττάρων της ζύμης είναι πολύ σημαντικός για την βελτίωση της διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης. Η ανάπτυξη των κυττάρων εξαρτάται από ποικίλες συνθήκες όπως από την θερμοκρασία, το pH καθώς και τη διαθεσιμότητα σε πηγή άνθρακα (τροφή). Το εύρος θερμοκρασίας ανάπτυξης της ζύμης έχει βρεθεί πειραματικά να είναι 30-40 °C με την βέλτιστη θερμοκρασία να είναι ~35 °C. Χαμηλότερες θερμοκρασίες φαίνεται να καθυστερούν την ανάπτυξη των κυττάρων ζύμης, ενώ οι υψηλότερες θερμοκρασίες απενεργοποιούν τα κύτταρα. Αντίστοιχα, η τιμή pH παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των κυττάρων ζύμης. Κύτταρα ζύμης του γένους *Saccharomyces cerevisiae* αναπτύσσονται σε εύρος τιμών pH 4-6. Τέλος, η διαθεσιμότητα σε πηγή άνθρακα (πχ γλυκόζης) παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των κυττάρων ζύμης. Όσο περιορίζεται η ποσότητα πηγής άνθρακα τόσο λιγότερο μπορούν να αναπτυχθούν τα κύτταρα.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της κυτταρικής συγκέντρωσης και κατ' επέκταση της κυτταρικής ανάπτυξης μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: έμμεσες και άμεσες.

Ένα παράδειγμα έμμεσης μεθόδου είναι η παρακολούθηση είτε της κατανάλωσης της πηγής άνθρακα, όπως της γλυκόζης, είτε της παραγωγής των προϊόντων του μεταβολισμού τους όπως στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι η αιθανόλη ή το CO₂.

Ένα παράδειγμα άμεσης μεθόδου είναι η μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης με θολοσιμετρία. Αυτή βασίζεται στην απορρόφηση του φωτός από τα αιωρούμενα κύτταρα, που περιέχονται σε δείγμα της καλλιέργειας των μικροοργανισμών. Η ένταση του απορροφούμενου φωτός μετριέται με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου. Η ένταση του απορροφούμενου φωτός στην κυψελίδα, που περιέχει το δείγμα, εξαρτάται από την κυτταρική συγκέντρωση και το πάχος της κυψελίδας/σωλήνα. Το φαινόμενο της μείωσης της έντασης του φωτός, που διέρχεται από την κυψελίδα, οφείλεται τόσο στην απορρόφηση, όσο και στη σκέδαση. Η ορθή διαδικασία απαιτεί τη χρήση κάποιου μήκους κύματος, που ελαχιστοποιεί την απορρόφηση από ουσίες που περιέχονται στο μέσο (συνήθως χρησιμοποιείται κάποιο μήκος κύματος στην περιοχή 600-700 nm), τη μέτρηση με βάση αναφοράς την απορρόφηση του 'τυφλού' δείγματος (πρόκειται για το μέσο της καλλιέργειας χωρίς κύτταρα) και τον τελικό υπολογισμό με τη χρήση καμπύλης αναφοράς. Η καμπύλη αναφοράς συνδέει την ένδειξη του φωτομέτρου (οπτική πυκνότητα) με μετρήσεις του ξηρού βάρους των κυττάρων.

Η μέθοδος της φασματοφωτομετρίας



Εικόνα 1: Αρχή λειτουργίας φασματοφωτομέτρου
(πηγή: <https://el.wikipedia.org/wiki/>) (προσαρμοσμένη)

Κάθε χημική ένωση απορροφά, μεταδίδει, ή ανακλά το φως (ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία), μέσα σε ένα ορισμένο εύρος μήκους κύματος. Η φασματοφωτομετρία είναι μια ποσοτική μέτρηση της ικανότητας που έχει ένα υλικό ή μια χημική ένωση να ανακλά ή να μεταδίδει το φως συναρτήσει του μήκους κύματος. Το φασματοφωτόμετρο είναι ένα όργανο που μετρά την ποσότητα των φωτονίων (την ένταση του φωτός) που απορροφώνται κατά τη διέλευση τους μέσα από ένα διάλυμα. Με το φασματοφωτόμετρο, η ποσότητα μιας γνωστής χημικής ουσίας (συγκέντρωση) μπορεί να προσδιοριστεί με τη μέτρηση της έντασης του φωτός που ανιχνεύεται (Εικ.1)

Πειραματικό μέρος A

Παραγωγή βιοαιθανόλης από γλυκόζη με τη βοήθεια κυττάρων ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*

Όργανα και διατάξεις

1. Υδατόλουτρο
2. Ζυγός
3. Δοκιμαστικοί σωλήνες
4. Ογκομετρικοί κύλινδροι
5. Ποτήρια ζέσεως
6. Πιπέτες (πουαρ)
7. Διάλυμα ενεργοποιημένης μαγιάς
8. Γλυκόζη
9. Μπαλόني
10. Γυάλινη ράβδος ανάδευσης

Πειραματική πορεία A

1. Σε ένα ποτήρι ζέσεως των 100mL ζυγίστε 15g ενεργοποιημένης μαγιάς που θα βρείτε στον κοινόχρηστο πάγκο.
2. Στην συνέχεια προσθέστε 20mL απεσταγμένο νερό και αναδεύστε το μίγμα .
3. Ζυγίστε και προσθέστε στο προηγούμενο μίγμα 15g γλυκόζη και αναδεύστε.
4. Χωρίστε το παραπάνω μίγμα σε ίσα μέρη σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες A και B.
5. Τοποθετήστε στο στόμιο του κάθε σωλήνα ένα μπαλόني.
6. Βυθίστε τον σωλήνα A σε υδατόλουτρο που θα είναι ρυθμισμένο στους 35 °C και τον σωλήνα B αφήστε τον σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Αφήστε τα δείγματα να επωαστούν στις παραπάνω συνθήκες για **περίπου 15 λεπτά**. Ανακινήστε τους σωλήνες περίπου κάθε 5 λεπτά.
8. Παρατηρήστε τα δείγματα.

Ερωτήσεις

1. Καταγράψτε τις παρατηρήσεις από το πείραμα αλκοολικής ζύμωσης. Τι παρατηρείτε στους σωλήνες A και B;

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. Ποια είναι η αιτία που αυξάνεται ο όγκος κατά την αλκοολική ζύμωση στους δύο σωλήνες; Ερμηνεύστε την διαφορά στα πειραματικά αποτελέσματα μεταξύ του σωλήνα A και B.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. Σε εργοστάσιο παραγωγής βιοαιθανόλης λόγω ενεργειακής κρίσης έγινε πρόταση για λόγους οικονομίας ενέργειας να κλείσουν την θέρμανση των δεξαμενών που πραγματοποιείται η αλκοολική ζύμωση. Ο υπεύθυνος παραγωγής αρνήθηκε λέγοντας ότι αυτό θα αποβεί επιζήμιο τελικά για την επιχείρηση.

Πιστεύετε ότι έχει δίκαιο ο υπεύθυνος; Αιτιολογήστε την απάντησή σας στηριζόμενοι στα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος.

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Πειραματικό μέρος Β

Προσδιορισμός μάζας κυττάρων ζύμης

Όργανα και διατάξεις

1. Φασματοφωτόμετρο
2. Δοκιμαστικοί σωλήνες φασματοφωτόμετρου
3. Βάση στήριξης σωλήνων φασματοφωτόμετρου
4. Πιπέτες (πουαρ)
5. Ογκομετρικοί κύλινδροι
6. Ποτήρια ζέσεως
7. Διάλυμα ζύμης συγκέντρωσης 0,4 g/L
8. Απεσταγμένο νερό
9. Άγνωστα δείγματα 6 και 7

Πειραματική πορεία Β

Σημ. 1: Λόγω της ύπαρξης ενός μόνο φασματοφωτομέτρου, ζητήστε από τον εργαστηριακό υπεύθυνο, όταν είστε έτοιμοι, να καθορίσει τη σειρά σας και τον διαθέσιμο χρόνο χρήσης του οργάνου.

Σημ. 2: Οδηγίες χρήσης του φασματοφωτομέτρου υπάρχουν τόσο στο φύλλο εργασίας σας, όσο και δίπλα στο φασματοφωτόμετρ. Διαβάστε προσεκτικά και ρωτήστε τον εργαστηριακό υπεύθυνο αν έχετε απορίες.

Σημ. 3: Σε κάθε περίπτωση κάντε 2 μετρήσεις και κρατήστε τον μέσο όρο των τιμών

- Σε ένα ποτήρι ζέσεως των 100mL πάρτε περίπου 40mL διαλύματος ζύμης συγκέντρωσης 0,4 g/L που θα βρείτε στον κοινόχρηστο πάγκο.
- Χρησιμοποιήστε το διάλυμα ζύμης συγκέντρωσης 0,4 g/L και το απεσταγμένο νερό και παρασκευάστε τα δείγματα 1 έως 5 σε δοκιμαστικούς σωλήνες φωτομέτρου, σύμφωνα με τον Πίνακα 1. Πριν από κάθε δειγματοληψία αναδεύστε καλά το διάλυμα ζύμης.
- Για τα άγνωστα δείγματα 6 και 7 πάρτε 12 mL από τα αντίστοιχα δείγματα που βρίσκονται στον κοινόχρηστο πάγκο και τοποθετήστε τα στους αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες.

- Φωτομετρήστε όλα τα δείγματα (σωλήνες 2 έως 7) στα 610nm. Ανακινήστε τα σωληνάκια πριν την εισαγωγή τους στην υποδοχή του φωτόμετρου, αφήστε τα να ηρεμήσουν για περίπου 15 δευτερόλεπτα και ακολούθως πάρτε τη μέτρηση.
- Χρησιμοποιείτε το δείγμα 1 ως τυφλό για να ρυθμίσετε το φωτόμετρο σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του φασματοφωτόμετρου που δίνονται παρακάτω.

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ

Το φασμαροφωτόμετρο είναι ρυθμισμένο και έτοιμο προς χρήση για απορρόφηση στα 610 nm.

1. Εισάγετε το τυφλό διάλυμα (απεσταγμένο νερό) στην ειδική υποδοχή και το σκεπάζετε με το «καπάκι»
2. Πατάτε το πλήκτρο «Μηδενισμός» (Zero)
3. Εισάγετε το δείγμα στην ειδική υποδοχή και το σκεπάζετε με το «καπάκι»
4. Πατάτε το πλήκτρο «Ανάγνωση» (Read) και σημειώνετε την απορρόφηση της δείγματος που εμφανίζεται στην οθόνη

Πίνακας 1

Στήλη 1	Στήλη 2	Στήλη 3	Στήλη 4	Στήλη 5
Δείγμα	mL Διαλύματος ζύμης	mL Απεσταγμένου νερού	Συγκέντρωση δια/τος ζύμης g/ L	Απορόφηση δια/τος στα 610nm.
Δοκιμαστικός σωλήνας 1 (τυφλό δείγμα)	0	12	0	0,0
Δοκιμαστικός σωλήνας 2	12	0	0,4	
Δοκιμαστικός σωλήνας 3	6	6		
Δοκιμαστικός σωλήνας 4	3	9		
Δοκιμαστικός σωλήνας 5	1,5	10,5		
Δοκιμαστικός σωλήνας 6 (άγνωστο δείγμα 6)	-	-		
Δοκιμαστικός σωλήνας 7 (άγνωστο δείγμα7)	-	-		

Ερωτήσεις

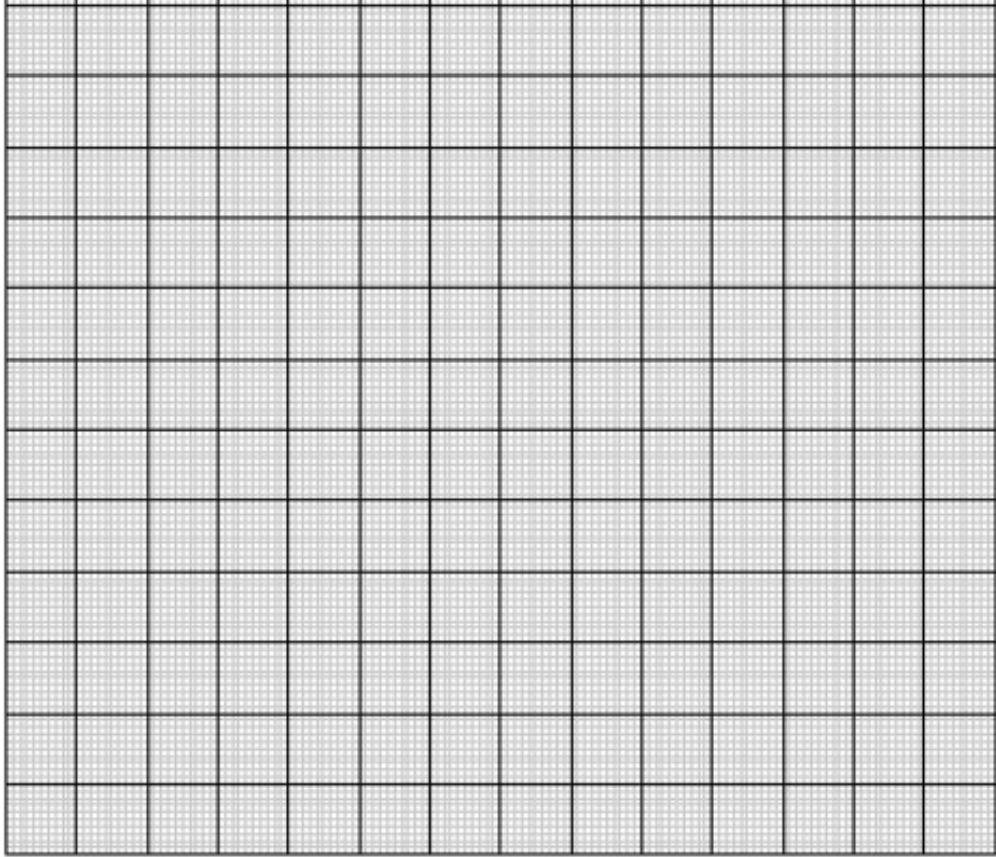
1. Από τον πίνακα 1 χρησιμοποιείτε τα δεδομένα από τις στήλες 2 έως 4 ώστε να υπολογίσετε και να συμπληρώσετε στον πίνακα τη συγκέντρωση της ζύμης σε g/L για τα διαλύματα 3 έως 5.
2. Συμπληρώστε στην στήλη 5 τις απορροφήσεις που έδωσαν τα δείγματα στα 610nm κατά την πειραματική διαδικασία.
3. Φτιάξτε σε χαρτί millimetre, που θα βρείτε παρακάτω στο φυλλάδιο, μια γραφική παράσταση των τιμών απορρόφησης που λάβατε από το φασματοφωτόμετρο (κατακόρυφος άξονας), σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των δειγμάτων (οριζόντιος άξονας).
4. Χρησιμοποιώντας την γραφική παράσταση, υπολογίστε την ποσότητα των κυττάρων ζύμης σε γραμμάρια ανά λίτρο καλλιέργειας (g/L) που υπάρχει στα δύο άγνωστα δείγματα 6 και 7.

Δείγμα 6.....

Δείγμα 7.....

5. Τα δείγματα 6 και 7 προέρχονται από δύο διαφορετικές καλλιέργειες κυττάρων ζύμης. Δώστε μια ερμηνεία για το ποιο παράγοντες μπορεί να έπαιξαν ρόλο και με ποιο τρόπο ώστε να προκύψει η διαφορά στην συγκέντρωση κυττάρων ζύμης που παρατηρήσατε για τα δείγματα 6 και 7. Βασιστείτε στις πληροφορίες που σας δίνονται στο θεωρητικό μέρος.

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....



Πειραματικό Μέρος Γ

Παρατήρηση κυττάρων ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* στο μικροσκόπιο

Οι ζυμομύκητες είναι στρογγυλοί ή ωσειδείς μονοκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι ανήκουν στο βασίλειο των Μυκήτων. Η μαγιά που χρησιμοποιούμε για την παραγωγή του ψωμιού, της μπίρας, του κρασιού, περιέχει ένα μεγάλο πληθυσμό ζυμομυκήτων, τους σακχαρομύκητες. Οι σακχαρομύκητες πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση, έναν τρόπο μονογονικής αναπαραγωγής κατά τον οποίο σε κάποιο σημείο του αρχικού κυττάρου αναπτύσσεται ένα εξόγκωμα, το οποίο ονομάζεται εκβλάστημα. Αυτό το εκβλάστημα όταν αναπτυχθεί αρκετά, είτε παραμένει ενωμένο με το αρχικό κύτταρο είτε αποκόβεται από αυτό και ζει ως αυτοτελής οργανισμός.

Όργανα και Υλικά

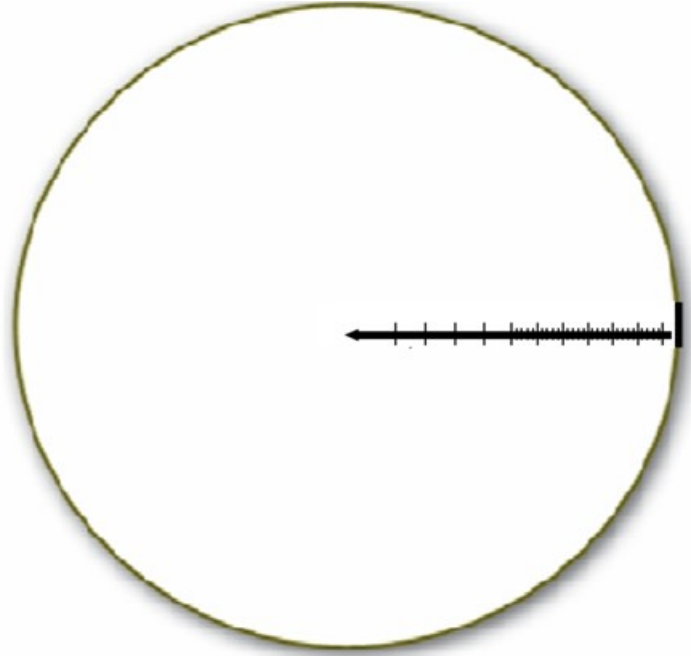
1. Οπτικό μικροσκόπιο
2. Αντικειμενοφόρες πλάκες
3. Καλυπτρίδες
4. Ποτήρι με απεσταγμένο νερό
5. Σετ εργαλείων μικροσκοπίας
6. Υδατικό ενεώρημα μαγιάς

Πειραματική πορεία Γ

1. Πάρτε 5-6 σταγόνες από το αρχικό δείγμα ενεργοποιημένων κυττάρων μαγιάς που θα βρείτε στον κοινόχρηστο πάγκο και αραιώστε σε ένα ποτήρι ζέσεως σε τελικό όγκο 200mL.
2. Από το αραιωμένο διάλυμα που ετοιμάσατε βάλτε μία σταγόνα στην αντικειμενοφόρο πλάκα.
3. Καλύψτε προσεκτικά με καλυπτρίδα. Σκουπίστε με απορροφητικό χαρτί το υγρό που περισσεύει και μεταφέρατε την αντικειμενοφόρο πλάκα στο μικροσκόπιο.
4. Παρατηρείστε από τη μικρότερη προς τη μεγαλύτερη μεγέθυνση.
5. Αναζητείστε στη μεγαλύτερη μεγέθυνση μια περιοχή στην οποία είναι διακριτά τα κύτταρα.
6. Δείξτε το οπτικό πεδίο στον επιτηρητή σας και σχεδιάστε κατόπιν 10-15 κύτταρα μαγιάς.

Ερωτήσεις

1. Σχεδιάστε 5-10 κύτταρα μαγιάς



2. Απαντήστε στα παρακάτω ερωτήματα.

A. Μεγεθυντική ικανότητα προσοφθάλμιου:

.....

B. Μεγεθυντική ικανότητα αντικειμενικού:

.....

Γ. Τελική μεγέθυνση παρασκευάσματος:

.....

3. Υπολογίστε τη διάμετρο ενός τυπικού κυττάρου, χρησιμοποιώντας την κατάλληλη μεγέθυνση και την κλίμακα που σας δίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Σχολικά μικροσκόπια		
Μεγέθυνση	Μεγάλη υποδιαίρεση	Μικρή Υποδιαίρεση
X40	111 μm	22 μm
X100	44 μm	8,9 μm
X400	11 μm	2,2 μm

Διάμετρος ενός τυπικού κυττάρου μαγιάς:

4. Από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι το πάχος μιας ανθρώπινης τρίχας είναι περίπου 80 μm , το πάχος ενός μόνο φύλλου χαρτιού είναι 100 μm ενώ τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα έχουν διάμετρο 6-8 μm . Μπορείτε να συγκρίνετε τα παραπάνω με το μέγεθος του κυττάρου μαγιάς που βρήκατε; Ποιο από τα παραπάνω έχει ίδιο περίπου μέγεθος με το ζυμομύκητα; Πόσο μεγαλύτερη/μικρότερη είναι η διάμετρος του ζυμομύκητα από το πάχος του φύλλου χαρτιού;

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Καλή Επιτυχία!

