Министерство образования Республики Беларусь

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»

Т. В. Макаренко, Е. Л. Зыкова, О. В. Пырх

АНАЛИЗ МИНЕРАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

Практическое пособие

для студентов специальности 1–31 01 01–02
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Гомель
ГГУ им. Ф. Скорины
2014

УДК 577.118(076)
ББК 28.57я73
М 151

Рецензенты:
кандидат сельскохозяйственных наук Т. В. Арастович;
доктор технических наук А. С. Неверов

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

Макаренко, Т. В.
М 151 Анализ минеральных компонентов растительного материала : практ. пособие / Т. В. Макаренко, Е. Л. Зыкова, О. В. Пырх ; М-во образования РБ, Гом. гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины, 2014. – 48 с.
ISBN 978-985-439-866-2

В практическом пособии рассмотрены основные теоретические вопросы, связанные с отбором и подготовкой к анализу проб растительного материала, приведены сведения о макро- и микроэлементах в составе растений, предложены конкретные методики для определения элементного состава растительного материала.

Адресовано студентам специальности 1-31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)».

УДК 577.118(076)
ББК 28.57я73

ISBN 978-985-439-866-2

© Макаренко Т. В., Зыкова Е. Л., Пырх О. В., 2014
© УО «Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, 2014

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Содержание

Введение…….. 4
Тема 1. Отбор проб растительных образцов…… 5
Тема 2. Высушивание и озоление растительных образцов…… 8
Тема 3. Макроэлементы в растениях……..……..…… 16
Тема 4. Микроэлементы в растениях…….…… 34
Литература……... 45

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Введение

Специфика объектов окружающей среды как объектов химического анализа заставляет подчеркнуть их изменяющийся состав, многокомпонентность и многофазность. Множество протекающих в природной среде химических, биохимических и биогеохимических процессов предопределяет чрезвычайную сложность химико-аналитических исследований.

Изучение элементного состава растений необходимо для более полной характеристики распределения химических элементов в природных и антропогенных ландшафтах, поскольку растения являются важнейшим звеном биологического круговорота веществ. С практической точки зрения, сведения о химическом составе пищевых и лекарственных растений необходимы как для сбалансированного питания человека, так и для профилактики и лечения заболеваний, связанных с дисэлементозами.

Химические элементы жизненно необходимы растениям в достаточных количествах, так как без них не могут протекать основные физиолого-биохимические реакции живого организма. Столь ответственная роль микроэлементов объясняется тем, что они входят в состав дыхательных пигментов, витаминов, гормонов, ферментов и коферментов, участвующих в регуляции жизненных процессов. Микроэлементы влияют на направленность действия ферментов и их активность. В настоящее время накоплено множество данных, подтверждающих зависимость элементного состава живых организмов, в том числе растений, от содержания химических элементов в среде обитания.

Задача предлагаемого пособия – оказать помощь студентам как в плане отбора проб растительных образцов и подготовки их к анализу, так и в плане проведения точного аналитического эксперимента и обработки экспериментальных данных. Пособие содержит описание лабораторных работ, которым предшествует краткое изложение теоретических основ, облегчающее выполнение конкретных теоретических задач.

Настоящее практическое пособие рекомендуется к использованию на занятиях по спецкурсу «Большой практикум», а также при выполнении курсовых и дипломных работ, при организации студенческой научно-исследовательской работы.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Тема 1. Отбор проб растительных образцов

Для получения наиболее достоверных результатов анализа растительного материала необходимо с первого момента работу с растением проводить очень точно и аккуратно. Прежде всего следует особое внимание обратить на взятие средней пробы для анализа.

Существует ряд моментов отбора растительных проб с опытных делянок и вегетационных сосудов, поскольку опыты могут быть различны по масштабам, условиям выращивания растений, биологическим особенностям опытных культур. Необходимо правильно взять пробу исследуемого материала, так чтобы она отражала действительную характеристику данных растений. В полевых условиях в зависимости от площади опытной делянки, культуры, состояния растений и фазы развития среднюю пробу отбирают одним из следующих методов: линейных метров, квадратных метров, по диагонали делянки или по рядам через определенное расстояние, кустами или отдельными растениями, всё растение или отдельные органы.

Для получения объединённой пробы растений массой 0,5–1 кг натуральной влажности рекомендуется отбирать не менее 8–10 точечных проб. Наземную часть травяного покрова срезают острым ножом или ножницами, не засоряя почвой, укладывают в полиэтиленовую плёнку или крафт-бумагу, вкладывают этикетку. Если нижняя часть растения загрязнена почвой, то нужно срезать растения на 3–5 см выше поверхности почвы.

В условиях вегетационных опытов для первоначальной пробы берется по несколько растений из каждого сосуда одного варианта или всё растение одного-двух сосудов по повторностям каждого варианта.

Чем больше неоднородность в развитии растений в пределах одной делянки или варианта опыта, тем большее число проб рекомендуется взять. *Первоначальную среднюю пробу* принято брать в одно и то же время – утром.

Однако для дальнейшей аналитической работы первоначальная проба может оказаться слишком большой, поэтому вторым важным этапом в подготовке растений к анализу является взятие *лабораторной средней пробы*. Для этого первоначальную пробу разбирают по ботаническому составу (например, из смеси трав отделяют клевер от тимофеевки), по размерам, внешнему виду, разделяя клубни, корнеплоды и плоды. Сухие и больные растения для анализа не берутся, но их количество, как и сорняков, учитывается. Из разобранного материала составляют среднюю пробу, характеризующую данные растения.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Взятое количество для пробы подсчитывают, взвешивают и разделяют по органам.

При анализе корневой системы среднюю лабораторную пробу перед взвешиванием осторожно промывают в водопроводной воде, ополаскивают в дистиллированной воде и подсушивают фильтровальной бумагой.

Отбор проб насыпанного зерна из автомобилей проводится механическим пробоотборником или вручную щупом (рисунок 1.1). По всем схемам точечные пробы отбирают на расстоянии от 0,5 до 1 м от переднего и заднего бортов и на расстоянии 0,5 м от боковых бортов.

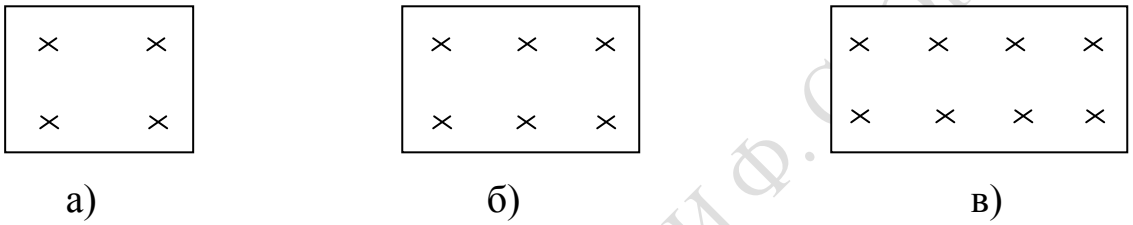

Рисунок 1.1 – Схема отбора проб насыпанного зерна из автомобилей:
а – с длиной кузова до 3,5 м; б – с длиной кузова от 3,5 до 4,5 м;
в – с длиной кузова от 4,5 м и более

Механическим пробоотборником точечные пробы отбирают из насыпи зерна по всей её глубине. Ручным щупом точечные пробы отбирают из верхнего и нижнего слоёв, касаясь щупом дна. В автопоездах точечные пробы отбирают из каждого кузова (прицепа).

Общая масса точечных проб при отборе по схеме А должна быть не менее 1 кг, по схеме Б – не менее 1,5 кг, по схеме В – не менее 2 кг.

Из защитных мешков точечные пробы отбирают мешочным щупом в 3 доступных точках мешка. Щуп вводят по направлению к средней части мешка желобком вниз, затем поворачивают его на 180° и вынимают. Образовавшееся отверстие заделывают крестообразными движениями острия щупа, сдвигая нити мешка. Общая масса точечных проб (объединённая проба) должна быть не менее 2 кг.

Объединённую пробу получают как совокупность точечных проб. Все точечные пробы ссыпают в чистую крепкую тару, исключающую изменение качества зерна. При использовании механического пробоотборника для отбора проб из автомобилей точечные пробы смешивают в процессе отбора проб и образуют объединённую пробу. В тару с объединённой пробой зерна вкладывают этикетку.

Лабораторная проба зерна или семян берётся из объединенной, которую распределяют ровным слоем на бумаге в виде прямоугольника,

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

делят на четыре части, берут материал из двух противоположных частей до нужного количества для анализа.

Пробы клубнеплодов и корнеплодов отбирают из буртов, насыпей, куч, автомашин, прицепов, барж, хранилищ и т. д. Пробы отбираются от однородной партии – любое количество его одного сортотипа, заготовленного с одного поля, хранящегося в одинаковых условиях.

Точечные пробы отбирают по диагонали боковой поверхности бурта, насыпи, кучи, или средней линии кузова автомашины, прицепа, вагона через равные расстояния на глубине 20–30 см. Клубнеплоды и корнеплоды берут в трёх точках подряд. Каждая точечная проба должна иметь массу около 1 кг. Точечные пробы помещают на брезент, соединяют и получают объединённую пробу.

Среднюю пробу массой около 1 кг для анализа выделяют из объединённой. Для этого объединённую пробу сортируют по величине на три группы: крупные, средние, мелкие. От каждой группы отбирают 20 % клубне- или корнеплодов, объединяют их, упаковывают и отправляют в лабораторию.

Травы с пастбищ или сенокосных угодий отбирают на выделенных 8–10 чётных площадках размером 1 или 2 м², располагая их по диагонали участка. Травостой скашивают (срезают) на высоте 3–5 см.

От зелёной массы, доставленной на ферму для непосредственного скармливания животным или для приготовления силоса, сенажа, искусственно высушенных кормов, точечные пробы берут вручную не менее чем из 10 разных мест порциями по 400–500 г. Отобранные точечные пробы зелёной массы собирают на брезент, тщательно перемешивают и расстилают ровным слоем, получая, таким образом, объединённую пробу. Из объединённой пробы зелёной массы отбирают среднюю пробу для анализа. Для составления средней пробы, масса которой должна быть 1,5–2 кг, траву берут порциями по 150–200 г из 10 различных мест.

Точечные пробы из партии сена или соломы, хранящихся в скирдах, стогах, отбирают по периметру скирд, стогов на равных расстояниях друг от друга на высоте 1,0–1,5 м от поверхности земли со всех доступных сторон с глубины не менее 0,5 м. Из точечных проб составляют объединённую пробу массой 2 кг. Для этого точечные пробы сена складывают тонким слоем (3–4 см) на брезенте или плёнке и осторожно перемешивают, не допуская ломки растений и образования трухи. Из объединённой пробы сена отбирают среднюю пробу для анализа. Для этого по всей площади и толщине слоя не менее чем из 10 различных мест отбирают пучки сена массой 60–120 г. Отобранную среднюю пробу массой около 1 кг упаковывают в плотную

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

бумагу, бумажный или полиэтиленовый пакет, куда помещают этикетку.

Одним из важных моментов в подготовке растительного материала к анализу является правильная фиксация его, если анализы не предполагается проводить в свежем материале.

Для химической оценки растительного материала по общему содержанию элементов питания (N, P, K, Ca, Mg, Fe и др.) образцы растений высушиваются до воздушно-сухого состояния в сушильном шкафу при температуре 50–60 ^{o}C.

В анализах, по результатам которых будут сделаны выводы о состоянии живых растений, следует использовать свежий материал, так как завядание вызывает существенное изменения состава вещества или уменьшение его количества и даже исчезновение веществ, содержащихся в живых растениях. Например, целлюлоза не затрагивается разрушением, а крахмал, белки, органические кислоты, и особенно витамины, подвергаются разложению после нескольких часов завядания. Это предполагает проведение анализа в свежем материале в очень короткие сроки, что не всегда возможно. Поэтому часто используют фиксацию растительного материала, цель которой заключается в стабилизации нестойких веществ растений. Решающее значение при этом имеет инактивация ферментов. Используются различные приёмы фиксации растений в зависимости от задач опыта.

Тема 2. Высушивание и озоление растительных образцов

При взятии для анализа навески растительного материала нужно стараться тщательно выбрать среднюю пробу. Для этого пакет следует развернуть, образец хорошо перемешать, разложить тонким слоем, разделить шпателем на 6–8 частей и из каждой части взять некоторое количество для взвешивания. Навеска растительного материала берётся на аналитических весах с точностью до четвёртого знака после запятой непосредственно в тигель или фарфоровую чашечку.

Все анализы растительного материала должны проводиться с двумя взятыми параллельно навесками. Лишь близкие результаты могут подтвердить правильность проведённой работы.

Результаты анализов могут быть рассчитаны как на воздушно-сухую, так и на абсолютно сухую навеску вещества.

Лабораторная работа 1. Определение гигроскопической влаги

При воздушно-сухом состоянии количество воды в материале находится в равновесии с парами воды в воздухе. Эта вода называется гигроскопической, и количество её зависит как от растений, так и от состояния воздуха: чем влажнее воздух, тем больше гигроскопической воды в растительном материале. Для пересчёта данных на абсолютно сухое вещество необходимо определить количество гигроскопической влаги в пробе.

Реактивы и оборудование:

1) стеклянные бюксы с крышками, эксикатор;
2) термостат;
3) аналитические весы.

Ход анализа

В стеклянный бюкс с притёртой крышкой, предварительно высушенный до постоянного веса, взять навеску растительного материала (2–4 г) на аналитических весах. Поставить бюкс с открытой крышкой в термостат и проводить высушивание при температуре 105 ^{o}C в течение 3 часов.

Закрыв бюкс крышкой, перенести в эксикатор, охладить до комнатной температуры (20–25 мин), взвесить (с горячими бюксами эксикатор закрывать через бумажную прокладку). Высушивание повторить в течение 1,5–2 ч до получения постоянного веса (в зависимости от вида растений и органа срок высушивания различный).

Расчеты ведут по формуле (в %):

$$H_2O = \frac{x \cdot 100}{y},$$

где $x = a - b$;

$y = a - c$;

a – масса бюкса с материалом до высушивания, г;

b – масса бюкса с материалом после высушивания, г;

c – масса пустого бюкса, г.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Лабораторная работа 2. Определение «сырой» золы

Сухое вещество растений содержит в себе как органические, так и минеральные соединения. Последние остаются после сжигания органических веществ в виде «сырой» золы, составляют в среднем 5–15 % сухого вещества растений. Процент невелик, однако в него входят такие важные для растений элементы, как фосфор, калий, кальций, магний, марганец, железо и др. В «сырой» золе помимо элементов питания растений содержатся некоторые примеси – углистые частицы, песчинки, плохо омытая почва.

Количество и состав золы изменяется в зависимости от культуры, органа растения, срока его развития, от почвенных и климатических условий, применения форм и доз удобрений, от агротехнических приёмов возделывания и других факторов.

Листья растений более богаты золой, чем стебли. С возрастом содержание золы уменьшается, изменяется её качественный состав, увеличивается содержание кальция, магния, уменьшается содержание калия, фосфора и других зольных элементов.

Для определения в растениях процента «сырой» золы используется метод сухого озоления. Чтобы определить качественный зольный состав растений, можно использовать как метод сухого озоления, так и метод мокрого озоления.

Метод сухого озоления основан на сжигании органических веществ при высокой температуре в муфельной печи. Он прост и может с успехом использоваться во всех лабораториях, не требуя особых условий. В полученной этим путём золе можно определить элементы, которые не улетучились при температуре 500 ^{o}C. К ним относятся калий, кальций, магний, марганец, алюминий.

Можно проводить озоление свежих, а также высушенных образцов.

Реактивы и оборудование:

1) фарфоровые чашки;
2) аналитические весы;
3) электроплитка;
4) муфельная печь.

Ход анализа

Прокалить в муфельной печи при температуре 500–600 ^{o}C фарфоровые чашечки объёмом 25 мл в течение 2–3 часов, доводя до постоянного веса, взвесить на аналитических весах.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

На аналитических весах, с точностью до десятичных долей грамма, взять навеску воздушно-сухого материала (около 1 г). Навеску укладывают рыхло в чашечку для свободного доступа кислорода и во время озоления не перемешивают. На слабом пламени горелки с сеткой на закрытой электроплитке или на специальной электроустановке с асбестом вести постепенное озоление материала, не допуская покраснения. Через 15–20 мин, когда материал обуглится и почернеет и прекратится выделение дыма, перенести чашки в нагретую муфельную печь. Озолять в течение 1,5–2 часов при температуре 450–500 °С, так как при более высокой температуре наблюдаются потери ряда элементов – в первую очередь хлоридов калия и натрия. Осторожно перенести чашки в эксикатор, охладить до комнатной температуры и взвесить на аналитических весах. Повторить озоление в течение 40–60 мин, охладить и взвесить. Озоление считается законченным, если разница двух последовательных взвешиваний не превышает ± 0,0005 г.

Зола может иметь разную окраску: светло-серую, серую, голубоватую, зеленоватую с бурым оттенком, что связано с присутствием микроэлементов – Cu, Mn, Fe и др.

Количество золы (в %) рассчитывается по формуле:

$$\text{Зола} = \frac{a \cdot 100}{н},$$

где a – масса золы, г;

$н$ – навеска воздушно-сухого материала, взятого для озоления, г;

100 – для выражения данных в %.

Масса золы (а) определяется по разности между последним весом чашечки с золой и весом пустой прокалённой чашечки.

Если расчёт нужно вести на абсолютно сухую навеску, одновременно с озолением материала ведут определение его гигроскопической влаги.

Тогда процент «сырой» золы вычисляется по формуле:

$$\%_{с.з.} = \frac{a \cdot 100 \cdot 100}{н \cdot (100 - y)},$$

где a – масса золы, г;

$н$ – навеска воздушно-сухого материала, взятого для озоления, г;

y – гигроскопическая влага растительного образца, %.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Данные опыта оформляются в виде таблицы 1.

Таблица 1 – Результаты определения содержания золы в растениях

Вариант опыта	№ чашки	Масса чашки, г	Масса чашки с навеской, г	Навеска, г	Масса чашки с золой, г			Масса золы, г	Зола %
					1	2	3		

Лабораторная работа 3. Растворение и определение качественного состава золы

Основную массу растений по химическому составу представляют четыре элемента органогена – углерод (45 %), кислород (42 %), водород (6,5 %), азот (1,5 %). При сжигании растений они улетучиваются в виде газообразных соединений, а оставшаяся несгораемая часть называется золой. Зола содержит большое количество элементов, среди которых различают макроэлементы (фосфор, сера, калий, кальций, магний), микроэлементы (кобальт, медь, цинк, марганец, молибден, бор), а также, железо, натрий, кремний, хлор и ряд других.

Зольный остаток различных органов растений составляет от 1 до 15 % их сухой массы. Так, в сухой древесине содержится около 1 % золы, в семенах – около 5 %, в стеблях и корнях – 4–6 %, в листьях – 15 %.

Для определения качественного состава «сырой» золы её нужно растворить.

Микрохимический анализ позволяет обнаружить в золе макро- и микроэлементы. В основе этого метода лежит свойство некоторых солей образовывать характерной формы кристаллы, по которым можно судить о наличии в составе золы того или другого элемента. Поскольку эти кристаллы малы, их форму и окраску выявляют при помощи микроскопа.

Реактивы и оборудование:

1) 20 %-ного раствор соляной кислоты (d = 1,12);
2) воронка, пробирки, стеклянные палочки;
3) предметные стекла, фильтровальная бумага, салфетки;
4) набор химических реактивов для качественного анализа;
5) микроскоп.

Ход анализа

Для избегания потерь золу в чашке следует смочить несколькими каплями дистиллированной воды (вливать осторожно по стенке чашки). Прилить цилиндром 5 мл 20 %-ного р-ра соляной кислоты и тщательно размешать небольшой стеклянной палочкой (работа ведётся в вытяжном шкафу). Прилить 10–15 мл горячей дистиллированной воды для более полного растворения золы и снижения концентрации раствора перед фильтрованием. Фильтровать раствор через небольшую воронку с беззольным бумажным фильтром, сливая по палочке в мерную колбу на 100 мл. Промыть чашечку и фильтр 4–5 раз горячей дистиллированной водой. Охлаждённый раствор довести до метки, закрыть чистой пробкой и взболтать.

Качественные реакции проводят на чистых (обезжиренных) предметных стеклах, на которые помещают каплю исследуемого раствора и на расстоянии 4–5 мм от нее – каплю соответствующего реактива. Затем чистой стеклянной палочкой с заостренным концом обе капли соединяют мостиком. При медленной кристаллизации образуются крупные, правильно сформированные кристаллы. Стеклянные палочки после нанесения каждого реактива необходимо вымыть и вытереть фильтровальной бумагой. Препараты подсушивают и рассматривают под микроскопом без покровного стекла.

Обнаружение ионов кальция (Ca^{2+}). Реактивом на кальций служит 1 %-ный раствор серной кислоты (H_2SO_4). При смешивании капли соляно-кислой вытяжки золы с каплей H_2SO_4 выпадают игольчатые кристаллы гипса.

Обнаружение ионов калия (K^+). На предметное стекло наносят каплю вытяжки и высушивают ее. На сухой остаток золы приливают каплю комплексной соли $Na_2PbCu(NO_2)_6$. При наличии калия в растворе в поле зрения видны черные и темно-коричневые кубической формы кристаллы.

Обнаружение ионов магния (Mg^{2+}). Для обнаружения магния капельку соляно-кислой вытяжки нейтрализуют аммиаком, а затем соединяют с каплей 1 %-ного раствора фосфорно-кислого натрия (Na_2HPO_4).После подогревания выпадают кристаллы в виде прямоугольников, звездочек, крыльев, крестиков.

Обнаружение фосфора (P). Реактивом служит раствор молибдата аммония $(NH_4)_2MoO_4$. Выпадают зеленовато-желтые кристаллы различной формы.

Обнаружение серы (S). Присутствие серы обнаруживают прибавлением к капле вытяжки 1 %-ного раствора азотнокислого стронция $Sr(NO_3)_2$. Образуются мелкие, закругленные блестящие кристаллы.

Обнаружение железа (Fe^{3+}). Реакцию на железо проводят в пробирке. К остатку зольной вытяжки добавляют по каплям раствор желтой кровяной соли $K_4[Fe(CN)_6]$ до появления синей окраски берлинской лазури.

Лабораторная работа 4. Мокрое озоление по Лебедянцеву

Метод основан на окислении органических веществ сильными окислителями – смесью концентрированных кислот. Он используется для определения в растительном материале зольных элементов – фосфора, калия, натрия, которые при сухом озолении теряются. Например, фосфорная кислота при температуре выше 350 ^oC восстанавливается до свободного фосфора и улетучивается. Этот метод длительнее сухого озоления, но даёт более точные результаты. С другой стороны, кальций удобнее определить после сухого озоления, так как при мокром озолении с серной кислотой образуется труднорастворимый осадок гипса ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$), требующий последующего растворения.

Метод мокрого озоления для определения главным образом фосфорных соединений в растениях предложил А. Н. Лебедянцев в 1916 году. Для окисления органических веществ растений была предложена смесь концентрированных азотной и серной кислот. Азотная кислота при взаимодействии с органическим веществом распадается на воду, двуокись азота и свободный кислород:

$4HNO_3 \rightarrow 4NO_2 + 2H_2O + O_2$.

Высокая концентрация азотной кислоты и выделяющийся активный кислород уже на холоде разрушают наиболее окисляющуюся часть органического вещества растений. При нагревании до 120,5 ^oC – температуры кипения азотной кислоты – окисление усиливается. Водород при этом окисляется до воды, углерод – до углекислого газа, сера –до серной кислоты и т. д.

Концентрированная серная кислота является более сильным окислителем. Её температура кипения равна 338 ^oC. При взаимодействии с органическими соединениями также выделяется активный кислород, способствующий озолению, пары воды и сернистый газ:

$2H_2SO_4 \rightarrow 2SO_2 + 2H_2O + O_2$.

После полного окисления органических соединений взятой навески, избыток азотной кислоты удаляется выпариванием с водой, после чего в растворе остаются соли серной и фосфорной кислот.

Озоление при этом методе удобнее проводить на специальной электрической установке.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Реактивы и оборудование:

1) концентрированная азотная кислота HNO_3 (ρ =1,40);
2) концентрированная серная кислота H_2SO_4 (ρ =1,84);
3) колбы Къельдаля;
4) элетроплитка;
5) мерная колба на 100 мл, мерный цилиндр;
6) капельница.

Ход анализа

На аналитических весах с помощью пробирки (навеску рассчитать по разности весов пробирки с анализирующим веществом и пробирки с остатками этого вещества) взять навеску 0,2–0,3 г и осторожно перенести её в колбу Къельдаля, стараясь опустить навеску на дно колбы, не распыляя по стенкам. Прилить цилиндром 15 мл концентрированной азотной кислоты и оставить в вытяжном шкафу для первоначального окисления на несколько часов (можно на ночь). Нагреть колбу осторожно на плитке с асбестом, не допуская бурного кипения, до прекращения выделения бурых паров оксидов азота (часто осторожно взбалтывать).

Когда объём раствора уменьшится примерно до 3–5 мл и раствор посветлеет, колбу снять с огня, оставить на несколько минут под тягой для охлаждения, после чего прилить цилиндром 1 мл концентрированной серной кислоты. Нагреть колбу на плитке без асбеста до появления белых паров сернистого газа. Большое количество серной кислоты и бурное кипение могут привести к потерям фосфора. После начала выделения явных белых паров снять колбу с огня, оставить для охлаждения и затем прилить из капельницы 10–15 капель концентрированной азотной кислоты. Снова нагреть до появления белых паров.

Прибавление азотной кислоты повторять до обесцвечивания раствора, т. е. до окончания озоления. В растворе может выпасть осадок солевой кремневой кислоты и гипса, что не мешает озолению органического вещества.

Прибавление азотной кислоты в избытке приведёт к охлаждению раствора и замедлению процессов окисления органических соединений. Озоление при недостатке азотной кислоты может вызвать обугливание вещества, что также приведёт к более длительному озолению и к снижению качества анализа.

Для контроля за концом озоления в охлаждённую колбу нужно осторожно по стенкам прилить 3–5 мл холодной дистиллированной воды. Если раствор остаётся бесцветным и из колбы не будут выделяться бурые пары, озоление считается законченным. При появлении зеленовато-жёлтого оттенка озоление следует продолжить. Окончив

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

озоление, прилить в колбу Къельдаля 20 мл дистиллированной воды и поставить на плитку с асбестом для упаривания до объёма 3–5 мл. Кипение должно быть умеренным.

Перенести раствор количественно с помощью горячей дистиллированной воды в мерную колбу объёмом 100 мл через небольшую воронку с беззольным фильтром. Охлаждённый раствор довести водой до метки, закрыть пробкой и взболтать. В этом растворе есть многие зольные элементы, которые можно определить. Для определения кальция необходимо образовавшийся осадок растворить на фильтре 10 %-ным раствором соляной кислоты.

Тема 3. Макроэлементы в растениях

Сухое вещество растений имеет в среднем следующий элементарный состав (в весовых процентах): углерод – 45, кислород – 42, водород – 6,5, азот и зольные элементы – 6,5. Всего в растениях обнаружено более 70 элементов. Около 20 элементов (в том числе углерод, кислород, водород, азот, фосфор, калий, кальций, магний, сера, железо, бор, медь, марганец, цинк, молибден, ванадий, кобальт и йод) считаются, безусловно, необходимыми для растений. Без них невозможны нормальный ход жизненных процессов и завершение полного цикла развития растений. В отношении еще более 10 элементов (в том числе кремния, алюминия, фтора, лития, серебра и др.) имеются сведения об их положительном действии на рост и развитие растений; эти элементы считаются условно необходимыми.

Четыре элемента – C, O, H и N получили название органогенных, на их долю в среднем приходится около 95 % сухого вещества растений. При сжигании растительного материала органогенные элементы улетучиваются в виде газообразных соединений и паров воды, а в золе остаются преимущественно в виде окислов многочисленные «зольные» элементы, на долю которых приходится в среднем всего около 5 % массы сухого вещества.

Азот и такие зольные элементы, как фосфор, сера, калий, кальций, магний, натрий, хлор и железо, содержатся в растениях в относительно больших количествах (от нескольких процентов до сотых долей процента сухого вещества) и называются макроэлементами.

Относительное содержание азота и зольных элементов в растениях и их органах может колебаться в широких пределах и определяется биологическими особенностями культуры, возрастом и условиями питания. Количество азота в растениях тесно коррелирует с

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

содержанием белка, а его всегда больше в семенах и молодых листьях, чем в соломе созревших культур. В ботве содержание азота больше, чем в клубнях и корнеплодах. В товарной части урожая основных сельскохозяйственных культур на долю золы приходится от 2 до 5 % массы сухого вещества, в молодых листьях и соломе зерновых, ботве корне- и клубнеплодов 6–14 %. Наиболее высоким содержанием золы (до 20 % и более) отличаются листовые овощи (салат, шпинат).

В золе семян зерновых и бобовых культур сумма оксидов фосфора, калия и магния составляет до 90 %, а среди них преобладает фосфор (30–50 % массы золы). Доля фосфора в золе листьев и соломы значительно меньше, и в ее составе преобладают калий и кальций. Зола клубней картофеля, корней сахарной свеклы и других корнеплодов представлена преимущественно оксидом калия (40–60 % массы золы). В золе корнеплодов содержится значительное количество натрия, а в соломе злаков – кремния. Более высоким содержанием серы отличаются бобовые культуры и растения семейства капустные.

В состав растений в относительно больших количествах входят кремний, натрий и хлор.

Азот входит в состав белков, нуклеиновых кислот, пигментов, коферментов, фитогормонов и витаминов. При недостатке азота тормозится рост растений, ослабляется образование боковых побегов и кущение у злаков, наблюдается мелколистность, уменьшается ветвление корней. Симптомом азотного дефицита является хлороз листьев – бледно-зеленая окраска листьев, вызванная ослаблением синтеза пигмента хлорофилла. Длительное азотное голодание ведет к гидролизу белков и разрушению хлорофилла в нижних более старых листьях и оттоку растворимых соединений азота к молодым листьям, точкам роста и генеративным органам. Вследствие разрушения хлорофилла окраска нижних листьев в зависимости от вида растения приобретает желтые, оранжевые или красные тона, а при сильно выраженном азотном дефиците возможно высыхание и отмирание тканей.

Фосфор входит в состав нуклеиновых кислот, нуклеотидов, фосфолипидов и витаминов. Содержание фосфора в растениях составляет около 0,2 % на сухую массу. Многие фосфорсодержащие витамины и их прозводные являются коферментами. Для фосфора характерна способность к образованию химических макроэргических связей с высоким энергетическим потенциалом. АТФ является энергетической валютой в живых организмах. Фосфорилирование активирует клеточные белки и углеводы и необходимо для таких процессов, как дыхание, синтез РНК и белка, деление и дифференцировка клеток, защитные реакции против патогенов и т. д.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Основной запасной формой фосфора у растений является фитин – кальций-магниевая соль инозитфосфорной кислоты. Содержание фитина в семенах достигает 2 % от сухой массы, что составляет 50 % от общего содержания фосфора.

Растения поглощают из почвы свободную ортофосфорную кислоту и ее двух- и однозамещенные соли, растворимые в воде, а также и некоторые органические соединения фосфора, такие как фосфаты сахаров и фитин.

При дефиците фосфора снижается скорость поглощения кислорода, снижается активность дыхательных ферментов, локализованных в митохондриях, и активируются ферменты (оксидаза гликолевой кислоты, аскорбатоксидаза) немитохондриальных систем окисления, происходит распад фосфорорганических соединений, тормозится синтез белков и свободных нуклеотидов. Наиболее чувствительны к недостатку фосфора молодые растения. Симптомом фосфорного голодания является синевато-зеленая окраска, в первую очередь, старых листьев нередко с пурпурным из-за накопления антоцианов или бронзовым оттенком (свидетельство задержки синтеза белка и накопления сахаров). Листья становятся мелкими и более узкими. Приостанавливается рост растений, задерживается созревание урожая.

Сера содержится в растениях в двух основных формах – окисленной в виде неорганического сульфата и восстановленной (аминокислоты, глутатион, белки). Процесс восстановления сульфата происходит в хлоропластах. Содержание серы в растениях составляет около 0,2 %. Однако в растениях семейства крестоцветных ее содержание значительно выше.

Одна из основных функций серы в белках – это участие SH-группы в образовании ковалентных, водородных и меркаптидных связей, поддерживающих трехмерную структуру белка. Дисульфидные мостики между полипептидными цепями и двумя участками одной цепи (по типу S-S-мостика в молекуле цистеина) стабилизируют молекулу белка. Сера входит в состав важнейших аминокислот – цистеина и метионина, которые могут находиться в растениях в свободной форме или в составе белков. Метионин относится к числу 10 незаменимых аминокислот и благодаря наличию серы и метильной группы обладает уникальными свойствами и входит в состав активных центров многих ферментов. Метиониновые остатки могут придавать молекуле белка гидрофобные свойства, что играет важную роль в стабилизации активной конформации ферментов в солевом окружении.

Сера входит в состав многих витаминов и коферментов, таких как биотин, коэнзим А, глутатион, липоевая кислота. В связи с этим сера

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

необходима для многих процессов обмена веществ (например, аэробная фаза дыхания, синтез жиров и так далее). Сера участвует в образовании полиаминов, которые влияют на структуру нуклеиновых кислот и рибосом, регулируют процессы деления клеток.

В почве сера находится в органической и неорганической формах. Органическая сера входит в состав растительных и животных остатков. Основные неорганические соединения серы в почве – сульфаты ($CaSO_4$, $MgSO_4$, Na_2SO_4). В затопляемых почвах сера находится в восстановленной форме в виде FeS, FeS_2 или H_2S.

Растения поглощают из почвы сульфаты и в очень незначительных количествах серосодержащие аминокислоты.

Недостаточное снабжение растений серой тормозит синтез серосодержащих аминокислот и белков, снижает фотосинтез и скорость роста растений, приводит к разрушению хлоропластов. Симптомы дефицита серы – побледнение и пожелтение молодых, а затем и старых листьев.

Калий поглощается растениями в виде катиона. Его содержание в растениях составляет, в среднем, 0,9 %. Концентрация калия высока в огурцах, томатах и капусте, но особенно много его в подсолнечнике. В растениях калий больше сосредоточен в молодых растущих тканях. Около 80 % калия содержится в вакуолях и 1 % калия прочно связан с белками митохондрий и хлоропластов. Калий стабилизирует структуру этих органелл.

Калий участвует в создании разности электрических потенциалов между клетками. Он нейтрализует отрицательные заряды неорганических и органических анионов. Калий в значительной мере определяет коллоидные свойства цитоплазмы, так как способствует поддержанию состояния гидратации коллоидов цитоплазмы, повышая ее водоудерживающую способность. Тем самым калий увеличивает устойчивость растений к засухе и морозам. Калий необходим для работы устьичного аппарата.

Известно более 60 ферментов, активируемых калием. Он необходим для включения фосфата в органические соединения, реакций переноса фосфатных групп, участвует в синтезе рибофлавина – компонента всех флавиновых дегидрогеназ. Под влиянием калия увеличивается накопление крахмала в клубнях картофеля, сахарозы в сахарной свекле, целлюлозы, гемицеллюлоз и пектиновых веществ в клеточной стенке, что приводит к повышению устойчивости соломины злаков к полеганию, а у льна и конопли повышает качество волокна.

При недостатке калия он может замещаться натрием, однако некоторые активируемые калием ферменты ингибируются натрием. При

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

недостатке калия листья желтеют снизу вверх – от старых к молодым. Их края и верхушки приобретают бурую окраску, иногда с красными пятнами, затем происходит их отмирание. Снижается функционирование камбия, нарушается развитие сосудистых тканей, уменьшается толщина кутикулы и стенок эпидермальных клеток, тормозятся процессы деления и растяжения клеток, что приводит к появлению розеточных форм растений. Недостаток калия вызывает остановку развития и гибель верхушечных почек, в результате чего активируется рост боковых побегов и растение принимает форму куста.

В почве содержится много *кальция,* и кальциевое голодание встречается редко, например, при сильной кислотности или засоленности почв и на торфяниках. Общее содержание кальция у разных видов растений составляет 5–30 мг на 1 г сухой массы. Много кальция содержат бобовые, гречиха, подсолнечник, картофель, капуста, гораздо меньше – зерновые, лен, сахарная свекла. В тканях двудольных растений кальция больше, чем у однодольных.

Кальций накапливается в старых органах и тканях. Это связано с тем, что реутилизация кальция затруднена, так как он из цитоплазмы переходит в вакуоль и откладывается в виде нерастворимых солей щавелевой, лимонной и других кислот.

В растениях имеется два запасных пула ионов кальция: внеклеточный (апопластный) и внутриклеточный в вакуоле и эндоплазматическом ретикулуме. Большое количество кальция связано с пектиновыми веществами срединной пластинки и клеточной стенки. Он содержится также в хлоропластах, митохондриях и ядре в комплексах с биополимерами в виде неорганических фосфатов и в форме иона.

Взаимодействуя с отрицательно заряженными группами фосфолипидов, кальций стабилизирует клеточные мембраны. При недостатке кальция увеличивается проницаемость мембран и нарушается их целостность. Изменения концентрации кальция в цитоплазме играют важную роль в структурных перестройках компонентов цитоскелета – актиноподобных белков, участвующих в процессах движения цитоплазмы, обратимых изменениях ее вязкости, в пространственной организации цитоплазматических ферментных систем. Процессы сборки-разборки микротрубочек регулируются уровнем ионов кальция наряду с ионами магния и гуанозинтрифосфата. Кальций активирует ряд ферментов, способствуя агрегации субъединиц, служа мостиком между ферментом и субстратом, влияя на состояние аллостерического центра фермента. Избыток кальция в ионной форме угнетает окислительное и фотофосфорилирование.

Кальций используется в растительных клетках как вторичный

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

посредник для контролирования многих процессов (закрытие устьиц, тропизм, рост пыльцевых трубок, акклиматизация к холоду, экспрессия генов, фотоморфогенез).

Регулирующее действие кальция на многие стороны метаболизма зависит от его взаимодействия с внутриклеточным рецептором кальция – белком кальмодулином. Это кислый с изоэлектрической точкой при pH 3,0–4,3 термостабильный низкомолекулярный (молекулярная масса 16,7 кДа) белок. Он обладает большим сродством с кальцием. Его комплекс с кальцием активирует многие ферменты, например, протеинкиназы (фосфорилирование белков), фосфоэстеразу, транспортную Ca^{2+}-АТФазу и другие. Кальмодулин может связываться с мембранами в клетке и легко переходит в цитозоль. Влиянием кальция на сборку и разборку элементов цитоскелета объясняют его необходимость для митоза, так как комплекс кальция с кальмодулином регулирует сборку микротрубочек веретена. Кальций участвует в слиянии везикул Гольджи при формировании новой клеточной стенки.

При недостатке кальция у делящихся клеток не образуются клеточные стенки и образуются многоядерные меристематические клетки. Недостаток кальция вызывает прекращение образования боковых корней и корневых волосков, приводит к набуханию пектиновых веществ, что вызывает ослизнение клеточных стенок и разрушение клеток. Также нарушается структура плазмалеммы и мембран клеточных органелл. Симптомами дефицита кальция является побеление с последующим почернением кончиков и краев листьев. Листовые пластинки искривляются и скручиваются. На плодах, в запасающих и сосудистых тканях появляются некротические участки.

Недостаток в *магнии* растения испытывают на песчаных и подзолистых почвах. Много магния в сероземах, черноземы занимают промежуточное положение. Водорастворимого и обменного магния в почве 3–10 %. Магний поглощается растением в виде иона Mg^{2+}. При снижении pH почвенного раствора магний поступает в растения в меньших количествах. Кальций, калий, аммоний и марганец действуют как конкуренты в процессе поглощения магния растениями.

У высших растений среднее содержание магния составляет 0,02–3 %. Особенно много его в растениях короткого дня – кукурузе, просе, сорго, а также в картофеле, свекле и бобовых. Много магния в молодых клетках, а также в генеративных органах и запасающих тканях. Около 10–12 % магния находится в составе хлорофилла. Магний необходим для синтеза протопорфирина IX – непосредственного предшественника хлорофиллов. Магний активирует ряд реакций переноса электронов при фотофосфорилировании, он необходим при

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

передаче электронов от фотосистемы I к фотосистеме II. Магний является кофактором почти всех ферментов, катализирующих перенос фосфатных групп. Это связано со способностью магния к комплексообразованию.

Магний необходим для многих ферментов гликолиза и цикла Кребса. Для 9 из 12 реакций гликолиза требуется участие металлов-активаторов и 6 из них активируются магнием. За исключением фумаразы, все ферменты цикла Кребса активируются магнием или содержат его как компонент структуры. Для двух из семи (глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа и транскетолаза) ферментов пентозофосфатного пути необходим магний. Он требуется для работы ферментов молочнокислого и спиртового брожения. Магний усиливает синтез эфирных масел, каучука, витаминов А и С. Ионы магния необходимы для формирования рибосом и полисом, связывания РНК и белка, активации аминокислот и синтеза белка. Он активирует ДНК- и РНК-полимеразы, участвует в формировании пространственной структуры нуклеиновых кислот.

Недостаток магния приводит к уменьшению содержания фосфора в растении, даже если фосфаты в достаточных количествах имеются в питательном субстрате. При недостатке магния тормозится превращение моносахаров в крахмал, слабо функционирует механизм синтеза белков, нарушается формирование пластид: матрикс хлоропластов просветляется – и граны слипаются, ламеллы стромы разрываются и не образуют единой структуры. При магниевом голодании между зелеными жилками появляются пятна и полосы светло-зеленого, а затем желтого цвета. Края листовых пластинок приобретают желтый, оранжевый, красный или темно-красный цвет, и такая, как бы мраморная, окраска наряду с хлорозом служит характерным симптомом нехватки магния. Признаки магниевой недостаточности сначала появляются на старых листьях, а затем распространяются на молодые листья.

Кремний обнаружен в составе всех растений. Особенно много его в клеточных стенках. Растения, накапливающие кремний, имеют прочные стебли. Недостаток кремния задерживает рост злаков (кукуруза, овес, ячмень) и двудольных растений (огурцы, томаты, табака, бобы). Исключение кремния во время репродуктивной стадии уменьшает количество семян, при этом снижается число зрелых семян и нарушается ультраструктура клеточных органелл.

Железо является основной частью веществ, необходимых для фотосинтеза (цитохромов, ферредоксина), ряда ферментов. Содержание железа в растительном организме составляет в среднем 0,02 % (по массе). Оно входит в состав ферментов, участвующих в создании

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

хлорофилла, хотя в него этот элемент не входит. Железо участвует в окислительно-восстановительных процессах, протекающих в растениях, так как оно способно переходить из окисленной формы в закисную и обратно. Кроме того, без железа невозможен процесс дыхания растений, поскольку оно является составной частью дыхательных ферментов.

Недостаток железа ведет к распаду ростовых веществ (ауксинов), синтезируемых растениями. Листья становятся светло-желтыми. Железо не может, как калий и магний, передвигаться из старых тканей в молодые (т. е. повторно использоваться растением).

Железное голодание чаще всего проявляется на карбонатных и сильноизвесткованных почвах. Особенно чувствительны к недостатку железа плодовые культуры и виноград. При длительном железном голодании у них происходит отмирание верхушечных побегов. Листья теряют зеленую окраску, затем белеют и преждевременно опадают.

Лабораторная работа 1. Определение органического углерода в растительном материале

Метод основан на окислении органического углерода бихроматом калия в кислой среде:

$$3C + 2K_2Cr_2O_7 + 8H_2SO_4 = 3CO_2 + 2Cr_2(SO_4)_3 + 8H_2O + 2K_2SO_4 .$$

При этом дихромат-ион восстанавливается до ионов трехвалентного хрома зеленого цвета, содержание которых эквивалентно количеству углерода. Для наиболее полного окисления используют избыток хромовой смеси, который не мешает определению концентрации ионов хрома (III) на фотоэлектроколориметре использованием оранжевого светофильтра.

Реактивы и оборудование:

1) глюкоза $C_6H_{12}O_6$ х.ч.
2) 0,4 н раствор хромовой смеси: 40 г $K_2Cr_2O_7$ растворяют в 800 мл дистиллированной воды, фильтруют в мерную колбу на 1 л, доводят дист. водой до метки и переливают в термостойкую колбу ёмкостью 2–3 литра, затем медленно порциями при охлаждении добавляют 1 л концентрированной серной кислоты;
3) мерные колбы емкостью 50 мл;
4) фотоэлектроколориметр.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ

Ход работы

Высушенный растительный материал размалывают на электромельнице (если плохо размалывается, то растирают в ступке). На аналитических весах берут навеску 1,0–3,0 мг (в зависимости от содержания углерода) и переносят в конические колбы ёмкостью 50 мл. Из бюретки со стеклянным краном по капелькам равномерно приливают 10 мл 0,4 н раствора хромовой смеси. Колбы закрывают стеклянным колпачком или воронкой и оставляют на 24 часа при комнатной температуре, изредка осторожно перемешивают круговыми движениями, так чтобы на стенках не остались кусочки растительного материала. По истечении суток в колбочки добавляют из бюретки по 40 мл дистиллированной воды, перемешивают содержимое и после охлаждения колориметрируют на ФЭКе (кювета 30 мм, светофильтр № 8). В качестве раствора сравнения используют «холостую пробу» (10 мл 0,4 н раствора хромовой смеси и 40 мл дистиллированной воды). Определение проводят в трёх-, пятикратной повторности. Содержание углерода определяют по калибровочному графику.

Содержание углерода вычисляют по формуле:

$$C = \frac{100 \cdot a}{н},$$

где C – содержание углерода в исследуемом материале, %;

a – количество углерода, найденное по графику, мг/50 мл;

$н$ – навеска исследуемого образца растительного материала, мг.

Построение калибровочного графика. 2,5022 г безводной глюкозы или 2,7524 г $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ растворяют в мерной колбе на 1 л. В 1 мл полученного раствора содержится 1 мг углерода.

В конические колбы на 50 мл приливают по 0,5; 1; 3; 5; 6 мл стандартного раствора глюкозы. Содержимое колб выпаривают на водяной бане досуха. Затем в колбы добавляют из бюретки по каплям 10 мл раствора хромовой смеси. Оставляют содержимое колб на 24 часа. По истечении времени приливают 40 мл дистиллированной воды, хорошо перемешивают и после охлаждения колориметрируют на ФЭКе (кюветы 30 мм, светофильтр № 8). Определение проводят в трёх-, пятикратной повторности. Строят калибровочный график зависимости оптической плотности от известного содержания углерода (по оси абсцисс – содержание углерода в 50 мл раствора, мг; по оси ординат – соответствующее значение оптической плотности).

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Лабораторная работа 2. Определение содержания общего азота с помощью реактива Несслера

Метод основан на измерении интенсивности окрашивания анализируемого раствора фотоколориметрическим методом. Окрашивание возникает в результате взаимодействия солей аммония с реактивом Несслера. Полученное соединение придает желтую окраску раствору, интенсивность которой зависит от концентрации в растворе аммиака.

$$NH_4C1 + 2K_2[HgI_4] + 4KOH = \downarrow[Hg_2ONH_2]I + KC1 + 7KI + 3H_2O$$

Присутствие в растворе ионов Mg^{2+}, Ca^{2+} и др. мешает определению аммония вследствие образования осадка с реактивом Несслера и вызывает помутнение раствора. Вредное действие примесей устраняется прибавлением к испытуемому раствору сегнетовой соли (калий-натрий виннокислый), связывающей мешающие ионы в недиссоциирующие соединения, тем самым устраняя их взаимодействие с реактивом Несслера.

Реактивы и оборудование:

1) реактив Несслера;
2) 25 %-ный р-р сегнетовой соли;
3) сульфат аммония х.ч.;
4) мерные колбы на 50 мл;
5) фотоэлектроколориметр, кюветы 50 мм.

Ход работы

Озоление растительного материала. Навеску 100–300 мг высушенного и измельченного растительного материала или 500–1000 мг сырого растительного материала отвешивают на аналитических весах и помещают в колбу Къельдаля емкостью 100 мл, заливают 5 мл смеси кислот (4 мл концентрированной серной кислоты + 1 мл 30 %-ной хлорной кислоты) и закрывают колпачком или воронкой. Смесь кислот готовят непосредственно перед сжиганием. Смесь оставляют на 1 час для первоначального озоления пробы, затем колбу подогревают на электроплитке или газовой горелке до появления белых паров, снимают с плитки, осторожно перемешивают, затем снова нагревают, перемешивают и т. д., пока не исчезнут крупные обуглившиеся комочки и образуется однородная темно-бурая масса. После этого колбу снова ставят на плитку и кипятят до полного обесцвечивания раствора. При озолении необходимо соблюдать меры предосторожности: работать только в вытяжном шкафу при закрытых шторках шкафа, в

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

защитных очках. После сжигания колбу с обесцветившимся раствором охлаждают в вытяжном шкафу. Затем содержимое переносят в мерную колбу на 100 мл, при этом хорошо обмывают дистиллированной водой колпачок или воронку, которыми закрывают колбу. Общий объем раствора доводят до 100 мл, тщательно перемешивают. В полученном растворе определяют азот, фосфор и калий. Параллельно с озолением пробы растительного материала проводят и холостое сжигание: в колбе Къельдаля точно также сжигают смесь кислот 5 мл и затем переносят в мерную колбу на 100 мл.

Определение азота. 1–2 мл исследуемого раствора наливают в мерную колбу вместимостью 50 мл, разбавляют водой примерно до 30–40 мл, приливают 2 мл 25 %-ного водного раствора сегнетовой соли, перемешивают, добавляют 2 мл реактива Несслера, доводят водой до метки, тщательно в течение 1 мин перемешивают и через 5 мин колориметрируют на ФЭКе при длине волны 420 нм (светофильтр № 4, кювета 50 мл). Содержание азота в анализируемом образце определяют по калибровочному графику.

Содержание азота вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{100 \cdot A \cdot V_1}{V_2 \cdot H},$$

где X – содержание азота, %;

A – показания по калибровочному графику, соответствующие показаниям оптической плотности, мг/50 мл;

V_1 – объем, в котором после мокрого озоления растворен образец, объемом 100 мл;

V_2 – объем исследуемого раствора, взятый непосредственно для определения оптической плотности, мл;

H – навеска образца, мг.

Построение калибровочного графика на азот. Запасной раствор: 0,472 г перекристаллизованного и высушенного при 105 ^{o}C до постоянного веса сульфата аммония перемещают в мерную колбу на 1 л, доводят дистиллированной водой до метки. Раствор содержит 0,1 мг/мл азота.

Образцовый рабочий раствор готовят из запасного, разбавляя его в 10 раз. Полученный раствор содержит 0,01 мг/мл азота.

В мерные колбы на 50 мл вносят по 1 мл холостого раствора, полученного при сжигании смеси кислот, и приливают разное количество рабочего раствора – 0; 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6 мл. В каждую мерную колбу добавляют 30–40 мл дистиллированной воды, затем 2 мл 25 %-ного раствора сегнетовой соли, 2 мл реактива Несслера, доводят водой до

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

метки и хорошо в течение одной минуты перемешивают. Через 5 мин приготовленные растворы колориметрируют на ФЭКе (кювета 50 мм, светофильтр № 4 (420 нм)). Все определения делают в трехкратной повторности.

Лабораторная работа 3. Определение содержания фосфора в растениях фотометрическим методом

В растениях фосфор содержится, главным образом, в виде сложных органических веществ. При осторожном озолении растений находящаяся в них фосфорная кислота остается в виде солей различных металлов. В данном методе о содержании неорганического фосфора в растворе судят по интенсивности синей окраски восстановленного фосфорномолибденового комплекса. Последний образуется в кислой среде из фосфорной и молибденовой кислот в присутствии солей двухвалентного олова. Оптическая плотность окрашенных растворов пропорциональна концентрации ионов фосфора.

Реактивы и оборудование:

1) аммоний молибденовокислый $(NH_4)_2\ MoO_4 \cdot 4H_2O$ – 25 г аммония молибденовокислого растворяют в 200 г горячей дистиллированной воды. После охлаждения раствор фильтруют через заранее промытый дистиллированной водой плотный фильтр в литровую мерную колбу.

Отдельно в термостойкой колбе готовят раствор серной кислоты: к 520 мл дистиллированной воды медленно, осторожно, не допуская перегрева, приливают 280 мл серной кислоты конденсированной. После охлаждения раствор серной кислоты приливают к раствору аммония молибденовокислого, доводят дистиллированной водой до метки и переливают в темную склянку, в которой раствор может сохраняться длительное время;

2) хлорид олова (II), $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,625 г $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в 25 мл 10 %-ного раствора HCl. Раствор нестоек, поэтому его готовят в день употребления;

3) мерные колбы на 50 мл;

4) фотоэлектроколориметр, кюветы на 50 мм.

Ход работы

Определение фосфора. Мокрое озоление растительных образцов для определения фосфора проводят по методике определения содержания общего азота.

1–2 мл исследуемого раствора наливают в мерную колбу

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

вместимостью 50 мл, разбавляют до 40 мл дистиллированной водой, приливают 2 мл раствора аммония молибденовокислого и хорошо перемешивают, затем добавляют 3 капли свежеприготовленного хлорного олова, доводят водой до метки, перемешивают и через 5 мин колориметрируют на ФЭКе (кювета 50 мл, светофильтр № 8).

Аналогично определяют оптическую плотность и для холостой пробы. Содержание фосфора определяют по калибровочному графику с учетом холостой.

Содержание фосфора вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{100 \cdot A \cdot V_1}{V_2 \cdot H},$$

где X – содержание фосфора, %;

A – показания по калибровочному графику, соответствующие показаниям оптической плотности, мг/50 мл;

V_1 – объем, в котором после мокрого озоления растворен образец, 100 мл;

V_2 – объем исследуемого раствора, взятый непосредственно для определения оптической плотности, мл;

H – навеска образца, мг.

Построение калибровочного графика на фосфор. 0,4387 перекристаллизованного и высушенного до постоянного веса при 105 ^{o}C однозамещенного фосфата калия KH_2PO_4 растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 1 л. Полученный запасной раствор содержит 0,1 мг/мл фосфора. Образцовый рабочий раствор готовят из запасного, разбавляя его в 100 раз. Полученный рабочий раствор содержит 0,001 мг/мл фосфора.

В мерные колбы на 50 мл наливают по 2 мл холостого раствора, разбавляют дистиллированной водой и добавляют в колбы разное количество рабочего раствора: 0; 2; 4; 6; 8; 10 мл. Затем приливают по 2 мл раствора аммония молибденовокислого и по 3 капли свежеприготовленного хлорного олова. Доводят водой до метки, тщательно перемешивают и через 5 мин приготовленные растворы фотоколориметрируют на ФЭКе (кювета 50 мм, светофильтр №8).

Все определения делают в трехкратной повторности.

Лабораторная работа 4. Определение калия методом пламенной фотометрии

Метод основан на распылении вытяжки с помощью сжатого воздуха с последующим сжиганием образовавшегося тумана в пламени

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

горелки. Находящиеся в вытяжке элементы при сгорании дают спектры с определенной длиной волны. Спектр интересующего элемента выделяют с помощью светофильтров и направляют на селеновый фотоэлемент, который преобразует световую энергию в электрическую. Силу возникающего тока измеряют гальванометром. Сила тока пропорциональна концентрации вещества в растворе и интенсивности излучения. Прежде, чем приступить к работе на пламенном фотометре, необходимо приготовить шкалу образцовых растворов.

Реактивы и оборудование:

1) хлорид калия (KCl) перекристаллизованный;
2) мерные колбы на 10 мл;
3) пламенный фотометр.

Ход работы

Для построения калибровочной кривой в качестве стандартного раствора используют перекристаллизованный KCl. Берут навеску 1,58 г соли и растворяют в мерной колбе на 1 л, в 1 мл стандартного раствора содержится 1 мг K_2O. Из него готовят шкалу образцовых растворов в мерных колбах на 100 мл. В колбы приливают 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 мл стандартного раствора, доводят до метки дистиллированной водой. Полученные образцовые растворы содержат K_2O в концентрациях 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 мг/100 мл, соответственно. Растворы анализируют на пламенном фотометре.

Порядок работы на пламенном фотометре:

1) включают сжатый воздух, устанавливают давление в пределах 0,4–0,6 атм., по воде проверяют работу всасывающего устройства и пульверизатора;

2) включают газ и регулируют пламя горелки;

3) используя калибровочный график, вычисляют процент K_2O в растительном материале по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot A \cdot V}{1000 \cdot H},$$

где X – содержание калия в исследуемом образце, %;

A – показания по калибровочному графику, соответствующие показаниям пламенного фотометра, мг/100 мл;

V – объем, в котором после мокрого озоления растворен образец, 100 мл;

1000 – пересчет навески в мг;

H – навеска образца, мг.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Лабораторная работа 5. Определение серы в растениях фотометрическим методом

Серу, содержащуюся в растениях окисляют до сульфат-ионов, которые затем осаждают хлоридом бария с последующим турбидиметрическим определением в виде сульфата бария. В качестве стабилизатора взвеси используют глицерин.

Реактивы и оборудование:

1) раствор азотнокислого магния: 4 г $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и доводят до 1 л в мерной колбе;

2) 2н раствор HCl;

3) раствор $MgCl_2$ в HCl: 200 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворить в 1 л 0,1 н HCl;

4) раствор хлоргидрата гидроксиламина: 25 г $NH_2OH \cdot HCl$ растворить в дистиллированной воде и довести до 500 мл дистилированной водой в мерной колбе;

5) осаждающий раствор А: 20 г хлорида бария растворяют в теплой дистиллированной воде 400 мл, добавляют 10 мл концентрированной HCl переносят в мерную колбу на 1л, приливают 500 мл глицерина и доводят до метки водой. Осаждающий раствор готовят в день определения.

Ход работы

Подготовка образца к анализу. 0,25–0,5 г мелкоизмельченного сухого вещества (0,25 г, если образец богат серой) помещают в тигель (кварцевый стаканчик), заливают 4 мл раствора азотнокислого магния, перемешивают осторожным поворачиванием тигелька, оставляют на сутки. Затем выпаривают на песчаной бане досуха. После этого прокаливают в муфеле при 600 ^oC в течение 1 часа до полного побеления реакционной массы и охлаждают. К полученному сухому остатку приливают 25 мл 2 н раствора соляной кислоты. При этом нейтрализуется зола (огарок). Перемешивают до полного растворения золя (можно немного подогреть). Если нужно, дополнительно центрифугируют или фильтруют в коническую колбу, откалиброванную на 50 мл, многократно промывая дистиллированной водой, доводя до метки (раствор Б).

Определение серы. 5–10 мл раствора Б помещают в мерную колбу на 50 мл, добавляют до 30 мл дистиллированную воду, 1 мл хлоргидрата гидроксиламина, затем прибавляют 10 мл осаждающего раствора А, доводят до метки, перемешивают в течение 1 мин и через 10 мин

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

фотоколориметрируют на спектрофотометре при длине волны 460 нм или ФЭКе, светофильтр № 4, длина кюветы 50 мм.

Построение калибровочного графика. Навеску 272 мг K_2SO_4 перекристаллизованного и высушенного при 105 ^oC до постоянного веса растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 1 л.

В полученном растворе содержится в 1 мл 50 мкг серы.

В мерные колбы на 50 мл приливают по 0; 1; 2; 3; 8; 10 мл исходного образцового раствора, что соответствует 50, 100, 150, 200, 400, 500 мкг серы. Добавляют до 30 мл воды, затем по 3 мл раствора $MgCl_2$, 1 мл раствора гидроксиламина и по 10 мл осаждающего раствора. После прибавления каждого реактива содержимое колбочки перемешивают. Доводят дистиллированной водой до метки, тщательно в течение 1 мин перемешивают и через 10 мин замеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 460 нм или на ФЭКе (светофильтр № 4) в кювете на 50 мм. Затем строят график зависимости содержания серы от оптической плотности.

Содержание серы рассчитывают по следующей формуле:

$$X = \frac{100 \cdot A \cdot V_1}{1000 \cdot V_2 \cdot H} = \frac{V_1 \cdot A}{10 \cdot V_2 \cdot H},$$

где X – содержание серы в растительном материале, %;

V_1 – общий объем, обычно 50 мл;

V_2 – объем раствора (фильтрата), взятого для анализа, мл;

H – навеска растительного материала, мг;

100 – пересчет, %;

1000 – пересчет, в мкг;

А – концентрация серы, найденная по графику, мкг/25 мл.

Лабораторная работа 6. Определение нитрат- и хлорид-ионов в пробах растительной продукции

Избыток минеральных питательных веществ в растительной продукции может быть причиной потери урожая и ухудшения его качества. К таким веществам относятся нитраты и хлориды, избыток которых обусловлен внесением высоких доз азотных и хлорсодержащих калийных удобрений, условиями произрастания растений (освещенность, плотность посева и др.), а также несбалансированностью минерального питания в период вегетации.

Растения могут содержать нитраты высокой концентрации, которые не участвуют в синтезе белковых веществ. Поэтому избыток

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

нитратов в растительной продукции – непроизводительная потеря азота. Кроме того, его соединения в повышенных дозах могут стать причиной отравления животных и человека.

Повышенное содержание хлоридов вызывает уменьшение содержания сухого вещества и крахмалистости картофеля, снижение сахаристости и повышение кислотности, что приводит к ухудшению вкуса плодов и овощей,.

Диагностику питания и агрохимический контроль за качеством растительной продукции значительно упрощает применение ионоселективных электродов. При этом возможно использование общего экстрагента для определения нитратов и хлоридов в растительной продукции, что повышает производительность аналитической работы.

Для определения нитратов используют мембранный ионоселективный электрод ЭМ-NO_3-01 в паре с хлорсеребряным электродом сравнения ЭВЛ-1М3.

Измерительная система для определения хлорид-иона состоит из мембранного электрода ЭМ-Cl-01 и хлорсеребряного электрода сравнения ЭВЛ-1М3. Измерение ведут на иономере ЭВ-74.

Реактивы и оборудование:

1) 1 %-ный раствор алюмокалиевых квасцов;
2) иономер, ионселективные электроды, хлорсеребряный электрод.

Ход работы

Экстракцию нитратов и хлоридов из растительного материала выполняют 1%-ным раствором алюмокалиевых квасцов при соотношении массы пробы к объёму экстрагирующего раствора 1:100 для сухих образцов или 1:4 для влажных проб.

Растительные пробы готовят к анализу следующим образом: сырой травянистый материал измельчают и после отбора средней пробы берут навеску массой 12,5 г. Навеску помещают в стакан гомогенизатора, приливают 50 мл 1 %-ного раствора алюмокалиевых квасцов и гомогенизируют 1 мин. При отсутствии гомогенизатора навеску растирают с прокалённым песком или битым стеклом в ступке до однородной массы, приливают 50 мл 1 %-ного раствора квасцов и 30 мин перемешивают в ротаторе или встряхивателе.

Плоды и корнеплоды перед анализом нужно отмыть от земли, обсушить фильтрованной бумагой и измельчить на тёрке. Из полученного образца отбирают среднюю пробу массой 12,5 г, заливают 1 %-ным раствором алюмокалиевых квасцов и взбалтывают 30 мин.

Ежедневно перед началом работы ионселективные электроды

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

следует помещать на 10 мин в дистиллированную воду, затем оба электрода (измерительный и вспомогательный) вынимают из воды и обсушивают фильтровальной бумагой.

Определение нитратного азота с помощью ионселективного электрода можно проводить на иономере ЭВ-74, используя калибровочный график и снимая показания в «мВ».

Нитратный ионселективный электрод подключают к гнезду «изм», а вспомогательный хлорсеребряный электрод к гнезду «всп». Кнопка «мВ» должна быть нажатой.

Для стандартных растворов проводят измерение ЭДС электронной пары. Активность ионов нитрата в исследуемых растворах находят, используя калибровочный график, построенный на миллиметровой бумаге в соответствии с таблицей 2.

На оси абсцисс откладывают величины pNO_3, соответствующие стандартным растворам азотнокислого калия в молях, на оси ординат – ЭДС (в мВ).

Для определения хлоридов в химические стаканы или другие технологические ёмкости отливают часть суспензии (20–25 мл), в неё погружают электродную пару, состоящую из хлоридселективного электрода и хлорсеребряного электрода сравнения с надетой на него ячейкой с 0,1М раствором KNO_3, и изменяют величину потенциала.

Прежде чем приступить к измерениям потенциала в исследуемых растворах, калибруют электроды по трём стандартным растворам, приготовленным в 1%-ном растворе алюмокалиевых квасцов. Для определения хлоридов используют стандартные растворы KCl концентрацией: $3 \cdot 10^{-4}$ М (pCl = 3,5), 10^{-3}М (pCl = 3,0) и 10^{-2}М (pCl = 2,0). При определении нитратов настраивают прибор по стандартным растворам KNO_3: 10^{-4}М (pNO_3 = 4,0), 10^{-3}М (pNO_3 = 3,0) и 10^{-2}М (pNO_3 =2,0).

Результаты исследований представляют в виде таблицы 2:

Таблица 2 – Содержание нитратов и хлоридов в растительной продукции

Объект исследования	pNO_3^-	Содержание NO_3^- в растительной продукции, мг/кг	pCl	Содержание Cl^- в растительной продукции, мг/кг
1				
2				
3				

Расчёт содержания ионов мг/кг (X) ведут по формуле:

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

$$X = \frac{M \cdot C \cdot V \cdot 1000}{m},$$

где M – молярная масса NO_3^- или Cl^-;

C – концентрация иона в экстрате;

V – объём экстрата навески (мл);

m – масса растительного объекта (г).

Тема 4. Микроэлементы в растениях

Микроэлементы – это группа незаменимых минеральных элементов, выполняющих важные функции в жизнедеятельности растительных организмов. Микроэлементы содержатся в живых организмах в очень малых количествах, в пределах 10^{-3}–10^{-12} %. Единственной характерной чертой микроэлементов является их низкая концентрация в живых тканях.

Микроэлементы участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, фотосинтезе, входят в состав активных центров ферментов, витаминов, повышают устойчивость растений к заболеваниям и неблагоприятным условиям внешней среды. Недостаток микроэлементов вызывает ряд заболеваний и приводит к гибели растений.

Накопление микроэлементов в растениях происходит в зависимости от вида почвы, ее физических свойств и химического состояния, географического расположения района, климатических условий, от вида, сорта и стадии вегетации растений, применяемых удобрений, источников орошения и других факторов.

Марганец. Различные органы одного и того же растения существенно различаются по содержанию марганца. В среднем содержание марганца в растениях составляет 0,01 % или 1 мг/кг сухой массы. Особенно богаты им зародыши, оболочки семян и зеленые листья. Содержание марганца в растениях зависит прежде всего от биологических особенностей самого растения и от содержания подвижных форм этого элемента в среде. Большое количество марганца содержится в водных растениях. В течение вегетационного периода количество подвижного марганца существенно меняется. Недостаток этого элемента для растений выражается в появлении на листьях мелких хлоротичных серовато-желтых пятен, располагающихся между жилками (форма пятен зависит от строения листьев растения и характера жилкования) и сливающихся постепенно в длинные полосы, идущие вдоль листа. В дальнейшем окраска полос темнеет, приобретает бурый оттенок.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Марганец оказывает на жизнедеятельность растений разностороннее влияние, но основной его физиологической функцией является участие в окислительно-восстановительных процессах, совершающихся в растительном организме. Повышая активность окислительных ферментов, этот элемент способствует большому накоплению в растениях продуктов окисления – аскорбиновой кислоты и органических кислот, а также окислению железа. При недостатке марганца в растениях увеличивается относительное содержание закисного железа, а при избытке, наоборот, повышается содержание окисных соединений этого элемента. Последнее объясняется тем, что окислительный потенциал марганца выше окислительного потенциала железа. Для нормальной жизнедеятельности растений железо и марганец должны находиться в определенном соотношении (примерно 2:1). Отмечена также большая роль марганца в процессе фотосинтеза. Однако следует учитывать, что избыток марганца в среде может оказать вредное действие на растение. В качестве микроудобрений можно использовать сульфат марганца, 0,012 %-ный раствор марганцовокислого калия и др. Вносится в виде $MnS0_4$ из расчета 0,4 мг на 1 л воды.

Бор. Относится к числу рассеянных элементов. Необходим для нормального хода многих важных физиологических процессов, происходящих в растениях. Под влиянием бора усиливается поглощение растениями катионов, особенно кальция, улучшается углеводный и белковый обмен. Бор образует с органическими веществами разнообразные соединения и прочно связывается в клетках. Этот элемент нужен для нормального деления клеток, их роста и дифференциации.

При борном голодании наблюдается остановка роста растения, затем появляется хлороз верхушечной точки роста. При сильном борном голодании точка роста отмирает, из пазух листьев развиваются боковые побеги, растение усиленно кустится, однако вновь образовавшиеся побеги вскоре также останавливаются в росте и у них повторяются все симптомы заболевания главного стебля. При сильно выраженном борном голодании растение образует очень мало цветков или вообще их не образует. Наблюдаются пустоцвет и опадание завязей; семена не завязываются или их образуется мало.

Наибольшее количество бора вносится с древесной золой, торфом. Следовательно, при внесении золы и торфа потребность растений в борных удобрениях в той или иной степени удовлетворяется. В торфе этот элемент содержится главным образом в форме органических соединений, нерастворимых или малорастворимых в воде, и поэтому усвояемость его зависит от скорости разложения торфа. Бор вносится в виде борной кислоты H_3B0_3 или буры $Na_2B_40_7$ из расчета 0,5 мг на 1 л воды.

Медь. Содержание меди в растениях, как и всякого другого элемента, зависит прежде всего от вида растения, а также от среды его произрастания. Наиболее богаты по общему содержанию меди красноземы и желтоземы, а наименьшее его количество содержится в торфяном грунте. Медь входит в состав ряда важных окислительных ферментов и выполняет специфическую роль в ускорении окислительно-восстановительных процессов, происходящих в живых организмах. Большое влияние она оказывает на образование в растениях хлорофилла. Под влиянием этого элемента усиливается образование в растениях белков, углеводов, жиров, витамина С, улучшается формирование органов плодоношения. При недостаточном содержании меди в среде растения развиваются плохо, снижается содержание в них хлорофилла, органы растений бледнеют и отмирают.

Цинк. Входит в состав всех растительных организмов. Так же, как марганец и медь, играет большую роль в окислительно-восстановительных процессах живых организмов, принимает непосредственное участие в синтезе хлорофилла и увеличивает интенсивность фотосинтеза. Положительно влияет на углеводный обмен и синтез белковых веществ в растениях, на образование витаминов группы В, а также витаминов С и Р, на процесс оплодотворения и развития зародыша. Специфическая роль цинка заключается в способности его содействовать росту растений. Дело в том, что под влиянием цинка в растениях увеличивается образование гормона роста – ауксина. При отсутствии этого элемента в питательной среде растения погибают вскоре после появления всходов, несмотря на наличие всех других элементов питания. В качестве микроудобрений можно использовать сульфат цинка.

Молибден. Значительная часть молибдена в грунте и воде связана с органическим веществом среды и переходит в более подвижные формы только в результате его минерализации. Поэтому все процессы, способствующие усилению разложения органического вещества, усиливают подвижность молибдена в среде. С другой стороны, все факторы, способствующие усилению кислотности грунта, вызывают переход молибдена в менее доступное для потребления растениями состояние.

Молибден необходим растениям для образования ферментов, под действием которых происходит восстановление в клетках нитратного азота. В связи с этим он играет большую роль в азотном обмене и синтезе белковых веществ, способствует усвоению азота, растворенного в воде. Установлено также участие молибдена в углеводном обмене, в синтезе хлорофилла и витаминов и положительное его влияние на образование в растениях аскорбиновой кислоты и каротина.

Кобальт. Содержится в растениях в различных количествах в зависимости от вида растений и условий, в которых оно произрастает. Наибольшее содержание кобальта обнаружено в водорослях (около 0,000025 % на сырое вещество), в болотных растениях его меньше – 0,000006 %. Как недостаток, так и избыток кобальта отрицательно отражаются на развитии растений.

Ванадий. Изучение роли ванадия в процессе фотосинтеза показало, что недостаток этого элемента вызывает значительное снижение в растениях содержания хлорофилла. Скорость фотосинтеза, рассчитанная на единицу хлорофилла, на фоне высокой интенсивности освещения при недостатке ванадия уменьшалась вдвое; при слабом же освещении добавление ванадия существенного влияния на скорость фотосинтеза не оказывало. Установлена также положительная роль ванадия в фиксации микроорганизмами атмосферного азота.

Йод. Основным источником поступления и накопления йода в грунте и водной среде является атмосферный йод. Содержание йода в растениях, так же как и всякого другого элемента, зависит от ряда факторов, важнейшими из которых являются биологические особенности самого растения и содержание подвижных форм этого элемента в среде произрастания.

Лабораторная работа 1. Фотометрическое определение меди с диэтилдитиокарбаматом свинца

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

Данный метод основан на образовании растворимого в органических растворителях комплекса ионов Cu^{2+}с диэтилдитиокарбаматом. Для определения меди в качестве реагента используют бесцветную и стабильную соль свинца. Ион меди вытесняет свинец, образуя окрашенный комплекс. Кроме меди только ионы серебра и ртути образуют с диэтилдитиокарбаматом соединения с большей величиной констант устойчивости и поэтому могут вытеснить свинец из комплекса. Поскольку эти ионы в растительных тканях практически отсутствуют, метод специфичен для меди.

Реактивы и оборудование:

1) 6н раствор HCl;

2) 30 %-ный раствор лимоннокислого аммония: 30 г двузамещенного цитрата аммония растворяют в 70–80 мл воды, дважды экстрагируют небольшим количеством хлороформенного раствора

диэтилдитиокарбамата свинца (хлороформенную фазу отбрасывают, раствор кипятят 10 мин, фильтруют, охлаждают и доводят водой в мерной колбе до 100 мл);

3) 2н раствор аммиака;

4) раствор диэтилдитиокарбамата: 300 мг уксуснокислого свинца $(CH_3COO)_2Pb$ растворяют в 50 мл воды. К раствору прибавляют 1,5 г сегнетовой соли, подщелачивают раствор несколькими каплями концентрированного КОН до появления слабо-розовой окраски по фенолфталеину (pH = 9 – 10), затем добавляют 1,5 г KCN.

Отдельно растворяют в 50 мл воды 400 мг натриевой соли диэтилдитиокарбамата, и растворы смешивают; при этом образуется суспензия, которую переливают в большую делительную воронку и экстрагируют 500 мл хлороформа при энергичном встряхивании. Водную фазу еще раз экстрагируют 200 мл хлороформа. Хлороформенные фракции объединяют, дважды промывают половинным объемом воды, фильтруют и доводят до 2 л хлороформом. Такой раствор может храниться в темноте в течение 2 недель;

5) безводный Na_2SO_4;

6) медный купорос;

7) индикатор крезол-рота;

8) делительная воронка емкостью 50–100 мл;

9) фарфоровые тигли; фарфоровая чашка; колбы на 50 мл;

10) водяная баня; муфельная печь; ФЭК.

Ход работы

Пробы растительного материала (300–500 мг) помещают в фарфоровые тигли и обугливают с 3–5 мл спирта. Раствор озоляют в муфельной печи при 450–500 ºС. Золу растворяют в 10 мл 6 н раствора HCl, переносят в делительную воронку и добавляют 2–3 капли свежей хлорной воды для окисления железа и меди.

Ионы металлов экстрагируют в эфир, для чего в делительную воронку прибавляют 15 мл перегнанного эфира, встряхивают и через 2 мин отделяют эфирный слой. Операцию повторяют 2 раза. Объединенную эфирную фракцию помещают в стакан или чашку для выпаривания и отгоняют эфир под тягой при полностью опущенных стеклах вытяжного шкафа на бане с горячей водой.

Сухой остаток после испарения эфира обрабатывают 4 мл 30 %-ного раствора лимоннокислого аммония, переносят с 10 мл воды в делительную воронку на 100 мл и добавляют каплю индикатора крезол-рота.

В раствор по каплям (под тягой) приливают 2н раствор аммиака до перехода окраски в фиолетовую (pH = 8,5), и вслед за этим, 10 мл

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

раствора диэтилдитиокарбамата. Делительные воронки энергично встряхивают в течение 5 мин.

После разделения фаз хлороформенный слой отделяют в пробирку, добавляют туда на кончике скальпеля безводный Na_2SO_4 для удаления капель воды и измеряют экстинкцию на спектрофотометре при 436 нм.

Для построения калибровочной кривой в пределах от 1 до 25 мкг меди в пробе используют раствор медного купороса. Стандартные растворы обрабатывают так же, как и опытные, начиная с момента экстракции ионов Cu^{2+} из подкисленных HCl растворов в эфир. Ионы Cu^{2+}сильно абсорбируются стеклом, поэтому стандартный раствор следует готовить в день употребления. Посуду перед определением необходимо вымыть 1 %-ной HNO_3, а затем многократно сполоснуть бидистиллятом.

Вычисляют процент содержания меди (в %) в растительном материале по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot A}{1000 \cdot H},$$

где A – концентрация меди в мг/мл, найдена по графику и соответствует оптической плотности испытанного раствора;

1000 – для пересчета навески (в мг);

100 – для пересчета (в %);

H – навеска (в г), соответствующая взятому для опыта объему раствора.

Лабораторная работа 2. Определение цинка с дитизоном

Метод основан на получении окрашенного комплекса цинка с дитизоном. Этот комплекс может быть экстрагирован CCl_4 и колориметрирован без удаления избытка дитизона (метод смешанной окраски).

Следы меди, свинца, серебра и некоторых других микроэлементов остаются в водной фазе вследствие образования прочных комплексов с тиосульфатом.

Реактивы и оборудование:

1) концентрированная HCl;
2) ацетатный буфер (pH = 5): 272 г кристаллического уксуснокислого

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

натрия ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) растворяют в бидистиллированной воде, добавляют 58 мл ледяной CH_3COOH и доводят объем до 1 л бидистиллятом;

3) 25 %-ный раствор тиосульфата натрия;

4) раствор дитизона в CCl_4: 0,04 г кристаллического дитизона растворяют в 100 мл CCl_4 при энергичном встряхивании в течение 15 мин. Раствор переносяют в делительную воронку и добавляют 100 мл разбавленного аммиака (0,5 мл концентрированного аммиака на 100 мл воды). Воронку встряхивают – дитизон переходит в водную фазу, окрашивая ее в ярко-оранжевый цвет. Слой CCl_4 сливают и отбрасывают; водную фазу промывают небольшими порциями (5–10 мл) чистого CCl_4, пока он не начинает окрашиваться в зеленый цвет. Затем водную фазу подкисляют 2,5 мл разбавленной H_2SO_4 (1:5), прибавляют к ней 100 мл CCl_4, встряхивают, отделяют зеленый слой дитизона в CCl_4 и сливают его в чистую делительную воронку. Раствор промывают 3 раза (порциями по 50 мл) бидистиллятом для удаления следов H_2SO_4, фильтруют через промытый и высушенный фильтр в темную склянку и хранят в холодильнике. Для приготовления рабочего раствора перед определением 15 мл исходного раствора дитизона разбавляют CCl_4 в мерной колбе на 0,5 л. При встряхивании 5 мл раствора с 25 мл 0,01 н аммиака слой CCl_4 должен быть бесцветным. Если он окрашен в бурый цвет, раствор дитизона для анализа непригоден;

5) металлический цинк;

6) метиловый красный;

7) делительная воронка емкостью 50–100 мл;

8) бюретка, колбы на 50 мл;

9) фарфоровые тигли, муфельная печь, ФЭК.

Ход работы

Пробы растительного материала (300–500 мг) помещают в фарфоровые тигли и обугливают с 3–5 мл спирта. Раствор озоляют в муфеле при 450–500 ºС. Полученную золу растворяют в 4 мл концентрированной HCl и количественно переносят с небольшим объемом воды в мерную колбу на 50 мл. Солянокислый раствор золы разбавляют так, чтобы содержание Zn в ней было от 0,2 до 1 мкг/мл, а концентрация HCl – порядка 0,3 н. Для этого при приготовлении сильно разбавленных растворов используют не только воду, но и растворы HCl.

Затем 10 мл разбавленного раствора помещают в делительную воронку емкостью 100 мл, прибавляют 2 капли индикатора метилового красного и по каплям раствор аммиака до перехода окраски от

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

розовой к желтой. В воронку приливают 5 мл ацетатного буфера, 1 мл 25 %-ного раствора тиосульфата натрия и хорошо перемешивают.

Из бюретки добавляют в воронку 20 мл свежеприготовленного раствора дитизона в CCl_4, закрывают воронку и энергично встряхивают в течение 1 мин. После расслаивания окрашенный слой CCl_4 колориметрируют на ФЭКе с зеленым светофильтром или на спектрофотометре при длине волны 538 нм.

Калибровочную шкалу готовят в интервале концентраций цинка от 0 до 5 мкг в 20 мл CCl_4. Для этого в серию делительных воронок приливают 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл стандартного раствора с содержанием цинка 1 мкг/см^3. Доводят объем до 10 мл добавлением 0,3 М раствора соляной кислоты, нейтрализуют 10 %-ным аммиаком, и далее анализируют как и исследуемые образцы. Вычисляют процент содержанием цинка в растительном материале по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot A}{1000 \cdot H},$$

где A – концентрация цинка (в мг/мл), найденная по графику и соответствующая оптической плотности испытанного раствора;

1000 – для пересчета навески (в мг);

100 – для пересчета (в %);

H – навеска (в г), соответствующая взятому для опыта объему раствора.

Лабораторная работа 3. Определение содержания марганца в растениях фотометрическим методом

Метод основан на окислении марганца до марганцевой кислоты персульфатом аммония в присутствии азотнокислого серебра в качестве катализатора и измерении оптической плотности окрашенного в розово-фиолетовый цвет раствора. Мешающее влияние хлоридов устраняют выпариванием анализируемой вытяжки досуха с азотной и серной кислотами. С помощью фосфорной кислоты мешающее определению железо связывается в бесцветный комплекс.

Реактивы и оборудование:

1) марганец сернокислый ($MnSO_4 \cdot 5H_2O$);
2) 30 %-ная перекись водорода;
3) концентрированная азотная кислота;
4) 10 %-ная серная кислота;
5) концентрированная ортофосфорная кислота;

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

6) 1 %-ный раствор $AgNO_3$;
7) аммоний надсернокислый (персульфат аммония);
8) мерные колбы на 50 см^3, химические стаканы, стеклянные палочки;
9) водяная баня, электроплитка;
10) спектрофотометр.

Ход работы

Аликвоту вытяжки 10–15 см^3 помещают в термостойкий стакан объемом 50 см^3, прибавляют 5 см^{3}концентрированной азотной кислоты, 2 см^3 30 %-ной перекиси водорода и выпаривают на плитке досуха. Операцию окисления проводят еще 2–3 раза. Затем добавляют 3 см^3 концентрированной азотной кислоты и снова выпаривают досуха. К сухому остатку добавляют 25 см^3 10 %-ной серной кислоты и нагревают на плитке до его полного растворения.

Затем добавляют 15 см^3 дистиллированной воды, 2 см^3 концентрированной ортофосфорной кислоты, 2 см^3 азотнокислого серебра и нагревают 5–10 мин. Если раствор помутнеет, то его следует довести до кипения и профильтровать через фильтр «синяя лента». К прозрачному горячему раствору в стакане прибавляют небольшими порциями 2 г персульфата аммония (не допуская вспенивания раствора), осторожно перемешивают стеклянной палочкой. После добавления каждой порции окислителя продолжают нагревание почти до кипения.

После появления устойчивой розово-фиолетовой окраски и прекращения выделения пузырьков озона раствор кипятят еще 1–2 мин. После охлаждения раствор переносят в мерную колбу на 50 см^3 и доводят дистиллированной водой до метки. Фотометрируют раствор в кювете с толщиной просвечивающего слоя 10–20 см^3, при длине волны 528–536 нм или зеленом светофильтре относительно нулевого раствора сравнения.

Калибровочную шкалу готовят в интервале концентраций от 0 до 250 мкг в 50 см^3 или от 0 до 0,5 мкг/ см^3. Для этого в серию стаканов объемом 100 см^3 помещают 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 см^3 стандартного раствора с содержанием 100 мкг/см^3 марганца, добавляют по 25 см^3 10 %-ной серной кислоты и уравнивают объемы растворов до 40 см^3 дистиллированной водой. Затем добавляют по 2 см^3 концентрированной ортофосфорной кислоты, 2 см^3 1 %-ного раствора азотнокислого серебра и нагревают до 80–90 ^{o}C 5–10 мин. Далее проводят все операции, как указано выше для анализируемых растворов.

Градуировочный график строят в координатах D–C (значение оптической плотности откладывают по оси ординат, концентрацию марганца в растворе – по оси абсцисс).

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Содержание марганца в мг/кг в растениях вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V_1}{V_2 \cdot m};$$

где C – концентрация марганца (в мкг/50 см^3), найденная по графику;

V_1 – объем исходного анализируемого раствора;

V_2 – объем аликвоты;

m – навеска пробы растений.

Лабораторная работа 4. Определение содержания кобальта фотометрическим методом с использованием 2-нитрозо-1-нафтола

Метод основан на получении окрашенного комплекса кобальта с 2-нитрозо-1-нафтолом и измерении оптической плотности раствора. С помощью цитрата устраняют мешающее влияние двухвалентного железа. Окрашенные соединения трехвалентного железа и меди с 2-нитрозо-1-нафтолом разрушают смесью азотной и фосфорной кислот.

Реактивы и оборудование:

1) маскирующий раствор готовят в день проведения анализа. В мерную колбу объемом 1000 см^3 помещают 400 см^3 40 %-ного раствора лимоннокислого натрия, 400 см^3 40 %-ного раствора уксуснокислого натрия и 40 см^3 концентрированного раствора перекиси водорода. Объем доводят до метки дистиллированной водой;

2) стандартные растворы сравнения кобальта с содержанием элемента 0,1–5 мкг в 1 см^3. Для приготовления используют кобальт сернокислый;

3) 2-нитрозо-1-нафтол, раствор в дистиллированной воде с массовой долей 0,1 %;

4) натрий лимоннокислый трехзамещенный, раствор в дистиллированной воде с массовой долей 40 %;

5) натрий уксуснокислый, раствор в дистиллированной воде с массовой долей 40 %;

6) перекись водорода;

7) колбы мерные объемом 100, 1 000 см^3;

8) пипетки объемом 1,2 и 25 см^3;

9) пробирки с притертыми пробками;

10) ФЭК.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Ход работы

Аликвоту 10 см^3 анализируемого раствора помещают в стакан объемом 50 см^3, добавляют 2 см^3 маскирующего раствора и 1 см^3 0,1 %-ного раствора 2-нитрозо-1-нафтола. Содержимое стакана доводят до кипения. После охлаждения анализируемого раствора в стакан добавляют 3 см^3 смеси азотной и фосфорной кислот и сразу же перемешивают. Содержимое переносят в градуированные пробирки объемом 20 см^3 и доводят до метки дистиллированной водой. Фотометрируют растворы относительно дистиллированной воды в кюветах с толщиной просвечивающего слоя 2 см при длине волны 520 нм (зеленый светофильтр).

Если содержание кобальта в анализируемом растворе ниже предела обнаружения, то для получения значимых величин можно сконцентрировать раствор упариванием. Для этого аликвоту анализируемого раствора 20 см^3 помещают в термостойкий стакан и приливают несколько капель концентрированной азотной кислоты. Содержимое упаривают на песчаной бане или закрытой электроплитке досуха. К осадку приливают 6 см^3 разбавленной соляной кислоты, доводят раствор до кипения, добавляют 2 см^3 маскирующего раствора и кипятят 1 мин. Реакция раствора должна быть в пределах от 5,6 до 6,0. При необходимости ее корректируют с помощью раствора уксуснокислого натрия. Затем приливают 1 см^3 0,1 %-ного раствора 2-нитрозо-1-нафтола, 5 см^3 дистиллированной воды и доводят до кипения. После охлаждения анализируемого раствора в стакан добавляют 3 см^3 смеси азотной и фосфорной кислот и сразу же перемешивают. Содержимое переносят в градуированные пробирки и далее проводят все операции, как указано выше при определении анализируемого раствора. Содержание кобальта в растениях (в мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V_1}{V_2 \cdot m},$$

где С – концентрация кобальта (мкг/20 см^3), найденная по графику;

V_1 – объем исходного анализируемого раствора;

V_2 – объем аликвоты;

m – навеска пробы растений (г).

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Литература

1 Малиновский, В. И. Физиология растений / В. И. Малиновский. – Владивосток: ДВГУ, 2004. – 121 с.

2 Полевой, В. В. Физиология растений / В. В. Полевой. – М.: Высшая школа, 1989. – 464 с.

3 Туманов, В. Н. Качественные и количественные методы исследования пигментов фотосинтеза: практикум к лабораторным занятиям / В. Н. Туманов, С. Л. Чирук. – Гродно: ГрГУ им. Я. Купалы, 2007. – 62 с.

4 Кретович, В. Л. Биохимия растений: учебник / В. Л. Кретович. – М.: Высш. школа, 1980. – 445 с.

5 Берёзов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 1998. – 286 с.

6 Диксон, М. Ферменты: в 3 т. / М. Дикон, Э. Уэбб. – М.: Мир,1982.

Т. 1. – М.: Мир, 1982. – 195 с.;

Т. 2. – М.: Мир, 1982. – 512 с.;

Т. 3. – М.: Мир, 1982. – 1122 с.

7 Горбачев, В. В. Витамины, микро- и макроэлементы / В. В. Горбачев, В. Н. Горбачева. – Минск: Книжный Дом; Интерпрессервис, 2002. – 544 с.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Производственно-практическое издание

Макаренко Татьяна Викторовна,
Зыкова Елена Леонидовна,
Пырх Ольга Викторовна

АНАЛИЗ МИНЕРАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

Практическое пособие

для студентов специальности 1–31 01 01–02
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»

Редактор *В.И. Шкредова*
Корректор *В.В. Калугина*

Подписано в печать 12.03.2014. Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. Ризография. Усл. печ. л. 2,8.
Уч.-изд. л. 3,1. Тираж 25 экз. Заказ 162.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/87 от 18.11.2013.
Специальное разрешение (лицензия) № 02330 / 450 от 18.12.2013.
Ул. Советская, 104, 246019, Гомель.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ