

МИНИСТЕРСТВО НАРОДНОГО ОБРАЗОВАНИЯ БЕЛОРУССКОЙ ССР

ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Ф. СКОРИНЫ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

к лабораторным работам по курсу "Биохимия
почв" для студентов специальности "Биология"



Гомель 1991

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

СКОРИНЫ

ВВЕДЕНИЕ

Определение состава минеральной части почвы

Составитель И.А. Лавров, кандидат технических наук

Рекомендована к печати методическим советом биологического факультета Гомельского государственного университета
И. С. Скорина

В состав минеральной части почвы в наиболее значительных количествах входят следующие элементы: $Si, Fe, Ti, Mn, Ca, Mg, S, P, K, Na$, которые обычно при анализах выражают в виде оксидов.

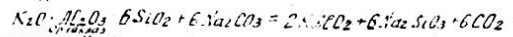
В значительной степени элементы, которые необходимо определить, связаны в кристаллических решетках первичных и вторичных минералов. Для перевода таких соединений в раствор почву сплавляют в основном с сернокислыми и углекислыми солями Na_2CO_3 ; смесь почвы с ними плавится при температуре $(700-900)^\circ C$, а первичные и вторичные минералы почвы плавятся при $1200-1800^\circ C$. Образующиеся щелочные соли кремниевой кислоты растворяют в HCl и определяют элементы. Кремниевая кислота мешает определению почти всех элементов, поэтому ее отделяют из анализируемой пробы. В фильтрате, освобожденном от кремниевых кислот, находят Ca, K, Mn, P, Ca, Li, Mg .

Наибольшая часть веса почвы приходится на долю соединений кремния. Характерная особенность этих соединений - их практическая нерастворимость.

Для перевода нерастворимых соединений почвы в растворимые прибегают к особой операции - сплавлению почвы с углекислыми щелочами или разложению ее фтористоводородной кислотой.

Разложение почвы сплавлением со смесью $K_2CO_3 + Na_2CO_3$

Разложение почвы углекислыми солями калия и натрия основано на образовании щелочных солей кремниевой кислоты и других растворимых соединений:



Примечание. Наиболее удобным плавлением считается безводная соль Na_2CO_3 , т.к. она имеет сравнительно низкую температуру плавления. Кроме того, соли натрия меньше адсорбируются осадками, чем соли калия.

В качестве плавления часто используют также смесь безводных углекислых солей калия и натрия в соотношении (1:1). Смесь, выпускаемая в продажу под названием калий-натрий углекислый $KNaCO_3$

содержит: $Na_2CO_3 - 47,5\%$
 $K_2CO_3 - 52,5\%$

Отдельные минералы, в состав которых входит кремний, плавятся

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

при очень высоких температурах $\approx 1215-1700^\circ\text{C}$.

Ход анализа.

Для сплавления берут 1 г почвы и 5 г плавня (Na_2CO_3 или $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{K}_2\text{CO}_3$ 1:1). 1 г плавня насыпают на дно платинового тигля, 3 г плавня смешивают с 1 г почвы, растертой в гудру в агатовой ступке, высыпают в платиновый тигель и покрывают сверху 1 г чистого плавня; тигель закрывают крышкой. Смесь уплотняют постукиванием, она должна занимать 1/2 часть тигля.

Почву взвешивают на аналитических, а плавень — на технических весах. Тигель помещают в холодную муфельную печь на асбест и нагревают до 1000°C , на что требуется 1,5–2 часа.

Нагревание прекращается, когда масса не вспучивается от пузырьков выделяющегося CO_2 .

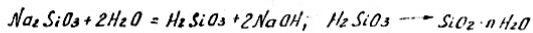
Тигель вынимают, ставят на асбест и охлаждают в течение 5–6 минут; затем снова ставят в печь на 1 минуту для расплавления массы у стенок тигля.

Извлечение сплава

Тигель со сплавом опускают на 2/3 высоты в фарфоровую чашку с водой. По охлаждении сплав обрабатывают дистиллированной водой (не более 20 мл) и круговым движением стеклянной палочки удаляют его из тигля в фарфоровую чашку.

Если сплав не выпадает из тигля, его снова обрабатывают горячей водой (20 мл) и снова стараются отделить от стенок с помощью стеклянной палочки.

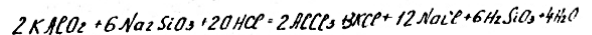
При обработке сплава водой происходит разложение натриевой соли метакремниевой кислоты с выделением белого геля по уравнению



После того как сплав полностью перенесен в фарфоровую чашку, приступают к разложению его соляной кислотой. Поскольку при взаимодействии углекислых солей с кислотой происходит бурное выделение CO_2 , сопровождаемое разбрызгиванием раствора, эту операцию необходимо проводить в чашке, закрытой стеклом, чтобы избежать потерь. Закрывают чашку стеклом (выпуклой стороной внутрь чашки) и, слегка приподняв его с одной стороны, осторожно приливают по стенке 20 мл HCl (уд.в. 1,19).

Разложение кислотой необходимо для перевода карбонатов в более растворимые хлориды. Избыток кислоты создает большую кислот-

ность среды, которая способствует полному выделению кремнекислоты из раствора. Разложение сплава кислотой на примере ортоклаза идет по схеме:



Размешивая раствор под стеклом пестиком, следят за изменением окраски содержимого чашки: по мере перехода карбонатов в хлориды раствор становится желтым (от хлорида железа), что служит показателем его кислой среды.

Чтобы освободить тигель от остатков сплава, его обмывают несколько раз 20%-ным раствором соляной кислоты, который сливают в ту же чашку.

Если разложение сплава идет медленно, рекомендуется чашку поставить на водяную баню и тем ускорить процесс растворения. Время от времени комочки следует раздавливать стеклянным пестиком, который с этого момента должен все время оставаться в чашке. Чашка должна быть прикрыта стеклом, чтобы раствор не разбрызгивался от выделяющегося CO_2 .

Изменение окраски раствора и прекращение выделения пузырьков газа служит признаком полного разложения углекислых солей. После этого снимают покровное стекло, обмывают его над чашкой дистиллированной водой и выпаривают раствор открытым на водяной бане.

В сухом остатке в первую очередь определяют кремниевую кислоту.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРЕМНИЯ (SiO_2)

Высокое содержание SiO_2 в поверхностном горизонте почв колеблется в пределах 43–80%, в песчаных подзолах оно может достигать до 97%. Кремний накапливается в почве в виде кварца и аморфной кремнекислоты, содержащей переменное количество адсорбированной кремнекислоты, а также в виде вторичных почвенных минералов. Накопление кремнекислоты в почве связано с процессом выветривания горных пород и минералов и с жизнедеятельностью высших и низших растений.

Поскольку валовое содержание SiO_2 в почве значительно, определение его проводят весовым методом.

При исследовании валового состава почв обычно пользуются неопи-санным солянокислым методом определения SiO_2 .

Солянокислый метод определения кремниевой кислоты

При добавлении соляной кислоты к образовавшимся при сплавлении силикатам натрия, калия в раствор переходит свободная метакремниевая кислота $Na_2SiO_3 + 2HCl \rightarrow 2NaCl + H_2SiO_3$

Чтобы перевести ее из состояния золя в гель, добавляют избыточное количество положительно заряженных ионов.

Метакремниевая кислота не дает истинных растворов, она переходит в раствор в виде золя, состоящего из отрицательно заряженных мицелл кремниевой кислоты.

Поскольку в двойном электрическом слое этой мицеллы в качестве противоионов находятся H^+ - ионы, прибавление в раствор соляной кислоты нарушает ионное равновесие и вызывает коагуляцию коллоидных частиц с образованием геля кремниевой кислоты $SiO_2 \cdot nH_2O$, который в виде белого студенистого осадка выделяется из раствора при его подкислении.

Ход анализа.

1. Полученный сплав охладить, прилить 30 мл химически чистой HCl (плотность 1,19) и нагреть на водяной бане (5-10 минут до 60-70° C) при перемешивании палочкой до полного его растворения, а далее выпарить до состояния влажных солей.

2. Вливают при помешивании по каплям 5 мл 1%-ного раствора желатины и ставят на баню с температурой 60-80° C на 5-10 минут.

3. Приливают 30 мл горячей дистиллированной воды, перемешивают содержимое и через 5-10 минут стояния на бане начинают фильтровать ее.

4. Фильтруют через фильтр с мацерированной бумажной массой в колбу на 250 мл.

5. Осадок кремниевой кислоты промывают на фильтре 1%-ной HCl до прекращения реакции на железо.

Примечание: Испытание на содержание железа проводят следующим образом: 1-2 мл HCl уд. в. 1,19 разбавляют 5 мл дистиллированной воды и прибавляют 1 мл 10%-ного раствора роданида (NH_4SCN или $KSCN$). Красная или розовая окраска свидетельствует о присутствии железа.

6. Промывают осадок горячей дистиллированной водой до потери реакции на хлор (исчезновение запаха хлора).

7. Осадок с фильтром подсушивают на воздухе, сжигают под тягой на горелке, помещают во взвешенном тигле в муфельную печь и прокалывают в течение 60-90 минут при 1000-1200° C до постоянной массы. Осадок ($SiO_2 \cdot nH_2O$) должен быть чисто-белого цвета, всякие оттенки связаны с недостаточной отмывкой.

Охладить в эксикаторе в течение 20-30 минут (на воздухе осадок легко адсорбирует воду).

Вычисление ведут по формуле:

$$SiO_2 = \frac{a}{c} \cdot 100 \%,$$

где a - масса прокаленного осадка;

c - навеска почвы, взятая для сплавления.

Реактивы.

1. HCl , плотность 1,19.

2. 1%-ный раствор желатины (1 г мелконарезанной желатины + 100 мл H_2O при 70° C. Ставят на водяную баню 70° C при перемешивании добиваются полного растворения желатины).

3. 1%-ный раствор HCl .

4. 10%-ный раствор роданида $KSCN$ или NH_4SCN (хранят в темной склянке).

5. Мацерированная бумажная масса. Бумажную массу готовят следующим образом. Фильтровальную бумагу режут на мелкие кусочки и помещают в коническую колбу, заливают 2%-ным раствором HCl . Массу нагревают до кипения. При нагревании бумага набухает и объем ее увеличивается. Прибавляют немного дистиллированной воды и снова кипятят при помешивании до тех пор, пока вся бумага не превратится в однородную массу. Разбавляют массу водой, отсасывают кислоту через бюхнеровскую воронку и промывают водой до нейтральной реакции фильтрата.

Отфильтрованную массу переносят в колбу и разбавляют водой до такого состояния, чтобы получилась однородная белая суспензия. Перед употреблением суспензию взбалтывают и берут требуемое количество ее пипеткой.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ Fe_2O_3 В ПОЧВЕ

Железо по распространению в природе занимает четвертое место после кислорода, кремния и алюминия. Содержание его в почве колеблется от 1 до 10%. В песчаных подзолах содержание Fe_2O_3 снижается до 0,30%, в бурой горнолесной почве Крыма доходит до 11,70%. В почве железо представлено в основном труднорастворимыми соединениями - ферриалмосиликатами, гидратом окиси железа, фосфатом железа и др.

В земной коре оно часто встречается в форме окислов: красно-го железняка Fe_2O_3 , гидрогематита $2Fe_2O_3 \cdot H_2O$, гетита $Fe_2O_3 \cdot H_2O$, бурого железняка $2Fe_2O_3 \cdot 3H_2O$. Содержание железа в растениях обычно составляет сотые доли процента.

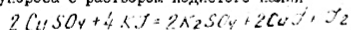
В глубь по почвенному профилю содержание железа в дорново-подзолистых и серых лесных почвах увеличивается; в черноземах, каштановых почвах и сероземах содержание железа изменяется сравнительно мало.

Содержание Fe_2O_3 определяют объемными йодометрическими и комплексометрическими методами, а также колориметрическим сульфосалициловым методом.

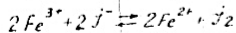
Йодометрическое определение окиси железа

Метод основан на выделении свободного йода при восстановлении трехвалентного железа йодид-ионом в присутствии йодистой меди CuI в качестве катализатора.

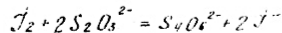
Йодистую медь белого цвета получают смешиванием раствора медного купороса с раствором йодистого калия



Окрашенный йодом бурый раствор обесцвечивают тиосульфатом ($N_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) после чего к катализатору приливают испытуемый раствор, содержащий железо. При взаимодействии трехвалентного железа с избытком KI происходит восстановление железа по уравнению



Выделившийся в эквивалентном количестве свободный йод оттитровывают тиосульфатом



8

и по количеству йода определяют содержание железа в растворе.

Ход анализа.

В коническую колбу емкостью 250 мл вносят 5 мл 0,1 н. раствора $CuSO_4$ и 10 мл 10%-ного раствора KI . Окрашенную йодом бурую смесь йодистой меди и KI оттитровывают 0,1 н. раствором тиосульфата до кремовой окраски, после чего приливают 2 мл 0,5%-ного раствора крахмала и продолжают титрование при энергичном взбалтывании раствора до обесцвечивания синей окраски крахмала. Поскольку это титрование является подсобной операцией, проводимой с целью освобождения раствора от йода, запись объема тиосульфата, использованного на восстановление I_2 при первом титровании не обязательна.

В оттитрованный раствор вносят аликвотную часть (20-25 мл) фильтрата от кремниевой кислоты и вторично титруют выделившийся йод раствором тиосульфата при тщательном перемешивании содержимого колбы. Титрование ведут до обесцвечивания синей окраски крахмала. Поскольку испытуемый раствор содержит соляную кислоту, белый осадок йодистой меди в оттитрованном растворе имеет зеленоватый оттенок от примеси двухлористой меди $CuCl_2$.

Записывают количество миллилитров и нормальность раствора тиосульфата, израсходованного на второе титрование, и вычисляют содержание железа в испытуемом растворе с учетом показаний колориметра.

Запись вести по форме.

Объемное определение Fe_2O_3 по Гану-Виндигу

Почва	Навеска сухой почвы, г	Объемной колбы, мл	Взято на определение		Затрачено на титрование		%
			мл	соответствует навеске в г	мл	нормальность	
Серая лесная	1,092	250	25	0,1090	1,35	0,02025	% =
Р.1, глуб.							$Fe_2O_3 = 0,02025 \times 1,35 \times 0,1090$
0-20см							$\times 0,09 \times 100 = 2,01$

Пример вычисления.

Определение Fe_2O_3 в 25 мл фильтрата от кремниевой кислоты, общий объем которого равен 250 мл. Взятая часть раствора соответствует 0,1091 г почвы, вычисленной при 100-105°C.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

На титрование затрачено 2,35 мл 0,02025 н. раствора тиосульфата ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

$$F_{\text{Fe}_2\text{O}_3} = \frac{2,35 \times 0,02025 \times 0,08 \times 100}{0,1031} \%$$

где 0,08 – грамм-экв значение мг-экв $F_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$. Эту величину получают следующим образом. Молекулярный вес $F_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$ – 160. Поскольку каждый из двух атомов железа, восстанавливаясь, приобретает по одному электрону, эквивалентный вес $F_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$ равен $160/2 = 80$. Следовательно, грамм-экв значение мг-экв $F_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$ соответствует $80/1000 = 0,08$.

Реактивы.

1. 0,1 н. раствор CuSO_4 . Отвешивают 12,5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, растворяют в 1 л дистиллированной воды, отфильтровывают в склянку и используют в работе. Мол. вес $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 249,62$, откуда один грамм-эквивалент медного купороса составляет $249,62 : 2 = 124,81$ г, а 0,1 грамм-эквивалент – 12,48 г.

2. 10%-ный раствор I_2 или KI . Раствор хранят в темной склянке.

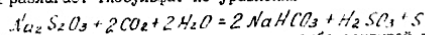
3. 0,1 н. раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

На технических весах отвешивают навеску х.ч. соли из расчета 25 г на 1 л раствора, растворяют в небольшом количестве сведепроткипяченной и охлажденной дистиллированной воды. Раствор доводят до заданного объема той же водой, хорошо перемешивая раствор.

В целях предохранения раствора от разложения добавляют 0,2 г углекислого натрия на 1 л приготовленного раствора, еще раз хорошо перемешивают и оставляют стоять в течение 12 дней. После отстаивания раствор переливают в чистую сухую склянку из темного стекла.

Установку титра проводят или по титрованному раствору, или точной навеске $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, или по йоду. Раствор готовят в количестве 5–10 л и используют непосредственно для титрования.

1. Вода должна быть хорошо прокаленной, т.е. свободной от CO_2 , т.к. CO_2 разлагает тиосульфат по уравнению



После кипячения воду следует охладить в колбе закрытой пробкой.

Титрование тиосульфатом ведут на холоде, т.к. горячая вода разлагает тиосульфат с выделением серы.

4. 0,5%-ный раствор крахмала. 0,5 г растворимого крахмала размешивают в химическом стаканчике с 5 мл дистиллированной воды. Полученную эмульсию вливают при помешивании в 100 мл кипящей воды и кипятят 2–3 мин (до просветления раствора). Раствор фильтруют через фильтр, смоченный горячей дистиллированной водой. Раствор крахмала годен к употреблению до тех пор, пока он дает с йодом соединение, окрашивающее раствор в синий цвет. Если окраска получается бурая, крахмал заменяют свежеприготовленным.

Определение железа с трилоном Б

Железо с сульфосалициловой кислотой $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6$ при РН-1,5 оттитровывают трилоном Б – комплексом III, который образует более прочный комплекс с Fe^{3+} . В точке эквивалентности происходит изменение окраски. Зная количество трилона Б, пошедшего на титрование железа, рассчитывают процентное содержание $F_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$. Определение возможно при содержании 1–100 мг $F_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$ в 100 мл.

Ход анализа.

1. В колбу на 250 мл берут 25 мл фильтрата от S_2O_3 , приливают 7 капель HNO_3 ($\rho = 1,4$) и нагревают до кипения (закисное железо переходит в окисное).

2. Нейтрализуют раствор 10%-ным NaOH до появления устойчивой муты (нейтрализацию ведут по каплям при помешивании).

3. Добавляют 10 мл 1,0 н. HCl и доводят объем раствора до 100 мл (РН должен быть 1,0–1,5).

4. Нагревают раствор до 50–55°C, прибавляют 1 мл 10%-ного раствора сульфосалициловой кислоты и медленно титруют трилоном Б при помешивании до перехода лилово-красной окраски в лимонно-желтую. В оттитрованном растворе после титрования железа определяют $F_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$. Вычисление ведут по формуле

$$F_{\text{Fe}_2\text{O}_3} = \frac{a \cdot T_{\text{Fe}_2\text{O}_3} \cdot 100}{C}$$

где a – объем трилона Б (мл), пошедший на титрование, за вычетом холостого титрования;

$T_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$ – титр молярного раствора трилона Б по окиси железа;

C – навеска сухой почвы.

Результаты анализа ведут по форме.

Определение железа с трилоном Б

Назва- ние почвы	Глуби- на взя- тия об- разца	На- вес- почвы, г	Объ- ем фильт- рата, мл	Взято фильт- рата на опре- деление, мл	Пошло трилона Б на титрование (вмл)	Пошло трилона Б на холостое тит- рование, мл

Вычисление титра трилона Б по окиси железа.
Если на титрование железа пошло А миллилитров 0,01 М раствора трилона, то это соответствует $A \times 0,01 \times 159,70$ мг Fe_2O_3 ,

где 159,70 - молекулярная масса Fe_2O_3 , в связи с этим $T_{Fe_2O_3}$ для формулы, по которой вычисляют процент Fe_2O_3 , равен для 0,1 м раствора трилона Б - 0,007965; 0,05 раствора - 0,003987; 0,01 м - 0,0007968.

Реактивы.

1. HNO_3 ($\rho = 1,4$).
2. 10%-ный раствор NH_4OH .
3. 1 н. раствор HCl .
4. 10%-ный раствор сульфосалициловой кислоты.
5. 0,01 М раствор трилона Б.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ MnO

Валовое содержание MnO в поверхностном горизонте почвы колеблется в пределах 0,06-0,27%. Сероземы, каштановые почвы и некоторые черноземы отличаются сравнительно малым содержанием марганца. Наибольшее количество MnO в почвенном профиле приурочено к верхним горизонтам, что доказывает биологическое накопление этого элемента. Из минералов, представляющих соединения марганца, наиболее распространены пиролюзит MnO_2 , браунит Mn_2O_3 , гаусманит Mn_2O_4 . Довольно часто встречается родонит $MnSO_4$ или марганцовый шпат $MnCO_3$.

Поскольку содержание марганца в почве обычно меньше 1%, $\frac{0,06}{100}$ определяют колориметрическим методом. Марганец можно определять персульфатным, периодатным или висмутатным методом.

Содержание марганца в марганцовых образованиях во многих случаях превышает 1% и достигает 10 и больше процентов. В этих случаях его выделяют из раствора в виде $MnSO_4 \cdot H_2O$ и определяют объемным или весовым методом (в виде $Mn_2P_2O_7$).

Периодатный метод определения окиси марганца

Ход выполнения. Фильтрат от кремниевой кислоты в количестве 25-50 мл досуха выпаривают в фарфоровой чашке на водяной бане. Сухой остаток 2-3 раза обрабатывают (к сухому остатку приливают 5 мл HNO_3 конц и 2 мл H_2O_2) раствором HNO_3 конц в целях вытеснения HCl и окисления восстановителей, смачивая азотной кислотой не только соли, но и стенки чашки, на которых могут задержаться хлориды.

После каждой обработки азотной кислотой остаток высушивают на бане до полного удаления HNO_3 .

Остаток растворяют в 10-20 мл 10%-ного раствора H_2SO_4 . Раствор переливают в химический стаканчик емкостью 100-150 мл, сливая содержимое чашки в стакан таким количеством, чтобы общий объем раствора в нем не превышал 40 мл.

В раствор прибавляют 1-2 мл H_2SO_4 ($\rho = 1,7$), вносят 0,5 г $K_2C_2O_4$, и нагревают раствор до кипения. Раствор кипятят до полного окисления марганца, о чем можно судить по достижению максимальной интенсивности окраски раствора.

Охлаждают раствор до комнатной температуры, переливают в мерную колбу емкостью 50-100 мл, доводят 10%-ной серной кислотой или дистиллированной водой до метки, перемешивают и сравнивают окраску с окраской эталонных образцов.

Серию эталонных растворов готовят следующим образом: образцовый раствор Mn^{2+} 0,2225 г K_2MnO_4 помещают в химический стакан и растворяют в 150-200 мл 3%-ного раствора H_2SO_4 . Приливают в кислый раствор несколько капель H_2O_2 (или 3%-ный раствор H_2O_2 с последующим кипячением бесцветного раствора в целях разрушения избытка перекиси водорода), охлаждают до комнатной температуры, переливают в колбу емкостью 1 л, доводят до метки 3%-ным раствором H_2SO_4 , перемешивают и получают раствор с содержанием 0,1 мг MnO в 1 мл.

Серия эталонных растворов. Поскольку эталонные растворы MnO готовят путем окисления Mn^{2+} при кипячении, нижеуказанные количества образцового раствора отмеряют бюреткой в химические стаканчики емкостью 100-150 мл:

№ эталона	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Количество мл образцового раствора	1	2	3	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Содержание (мг в 100 мл)	0,1	0,2	0,3	0,5	0,75	1,0	1,25	1,50	1,75	2,0

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

В каждый стаканчик приливают по 50 мл дистиллированной воды и по 1 мл H_3PO_4 ($\rho=1,7$), после чего прибавляют по 1 мл H_3PO_4 , 1%-ного раствора $AgNO_3$ и по 1 г сухого персульфата ($(NH_4)_2S_2O_8$) перемешивают и нагревают до кипения. После 3-минутного охлаждения добавляют еще персульфата, пока интенсивность окраски не перестанет усиливаться при нагревании. Окрашенный раствор охлаждают до комнатной температуры, переливают в мерную колбу емкостью 100 мл, доводят до метки 5%-ным раствором серной кислоты, перемешивают и используют для сравнения с испытуемым раствором.

Пример вычисления. Определение проведено в 50 мл фильтрата от кремниевой кислоты из общего его объема в 250 мл, что соответствует 0,2062 г почвы, высушенной при 100-105°. Сравнение окрасок проводили в колориметре. Для сравнения взят эталон, содержащий 0,3 мг MnO в 100 мл раствора. Высота эталонного раствора - 50 мл, испытуемого - 49,8 (среднее из трех отсчетов). Величина отношения

Периодатами называют соли йодной кислоты HIO_4 .

Баловое содержание MnO в почвах обычно не превышает 0,1-0,75 мг в 100 мл, т.е. соответствует 1-5-эталонным растворам, поэтому можно ограничиться только приотвлечением 5%-ных растворов.

равна $\frac{50}{49,8} \times 1,0$ %MnO = $\frac{0,3 \times 1,0 \times 100}{0,2062 \times 1000} = 0,145$ (0,15%)

Реактивы.

1. HNO_3 ($\rho=1,4$);

2. 10%-ный раствор H_2SO_4 ;

3. H_3PO_4 ($\rho=1,7$);

4. Персульфат $(NH_4)_2S_2O_8$;

5. Периодат калия или натрия KIO_4 кристаллический. Если готового нет, его готовят следующим образом.

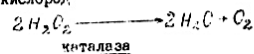
В фарфоровом тигле смешивают 30 г KIO_3 (йодат) с 25 г MnO_2 и нагревают смесь при темно-красном калении в течение 1 часа (отвешивание MnO_2 производят в стакане, если расплавленная масса прольется на стол, ее засыпают песком, а не водой во избежание воспламенения).

После охлаждения массу растирают в ступке (надеть очки!), переносят в стакан и промывают холодной водой 2-3 раза порциями по 100 мл, а потом в воронке Бюхнера, пока порция промывной воды не будет давать от капли фенолфталеина слабо-красную окраску. Препарат высушивают и вновь измельчают. KIO_4 белый кристаллический порошок, малорастворимый в холодной воде.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАТАЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Ферменты, относящиеся к классу оксидоректаз, катализируют окислительно-восстановительные реакции, играющие ведущую роль в биохимических процессах в клетках живых организмов и в почве. Активность окислительно-восстановительных ферментов находится в корреляционной зависимости с основными физико-химическими свойствами, микробиологическими процессами в почве, нитрификацией, сульфификацией.

Катализирует реакцию разложения перекиси водорода на воду и молекулярный кислород



Перекись водорода образуется в процессе дыхания растений и в результате биохимических реакций окисления органических веществ. Роль каталазы в почве заключается в том, что она разрушает ядовитую для растений перекись водорода.

Методы определения каталазной активности почв основаны на измерении скорости распада перекиси водорода при взаимодействии ее с почвой. По объему выделенного кисл. газа определяется активность каталазы газометрическим методом, основанным на измерении скорости разложения перекиси водорода при ее взаимодействии с почвой, или по количеству неразложившейся перекиси, которое учитывается путем перманганатометрического титрования. Газометрический метод быстрый, наиболее точный, не требующий сложной аппаратуры, более широко применяется в практике.

Ход анализа

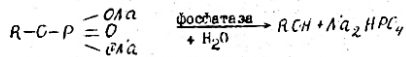
Навеску просеянной почвы 1 г внести в толстостенную колбу или склянку емкостью 100 мл, добавить 0,5 г $CaCO_3$. Осторожно на дно колбы поставить пинцетом маленький стаканчик с 5 мл 3%-ного раствора перекиси водорода. Колбу плотно закрыть каучуковой пробкой, имеющей трубку, соединенную толстостенным каучуком через тройник, снабженный зажимом или краном, с биреткой. Последняя сообщается с грушей, биретка и груша заполнены водой. Уровень воды в биретке и груше уравнивают и последнюю закрепляют на определенной высоте. Закрывают кран, тем самым устраняя сообщение прибора с внешней средой. Нужно следить, чтобы уровень воды в биретке оставался неподвижным, что свидетельствует о достижении температурного равновесия в приборе и ксminate.

начало опыта отметить по секундомеру в тот момент, когда стаканчик с перекисью водорода опрокидывается и вслед за этим встряхивается содержимое колбы. Взбалтыванию смеси следует продолжать во все время опыта, не касаясь непосредственно колбы руками. Выделяющийся кислород вытесняет из пробирки воду, уровень которой отметить. Контролем служит стерилизованная сухим жаром (180°) почва.

Количество выделившегося молекулярного кислорода учитывается при температуре 18-20° через подмычку в течение 1-2 минут. Активность каталазы выражается в миллиметрах кислорода, выделившегося на 1 г почвы за определенный промежуток времени (1 мин) Ошибка определения до 5%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФАТНОЙ АКТИВНОСТИ

Фосфатаза относится к группе ферментов, катализирующих гидролиз фосфоорганических соединений по фосфорноэфирным связям:



В почве имеются кислые и щелочные фосфатазы, гидролизующие моноэфиры с выделением минерального фосфора и органического радикала субстрата.

Методы определения активности почвенных фосфатаз основаны на измерении отщепленного при ферментативной реакции неорганического фосфата или органической части молекулы субстрата - фосфорорганического соединения. Щелочная фосфатаза определяется при pH 8, кислая - при pH 5,4; общая фосфатазная активность почвы определяется при pH естественной почвы.

Фосфорорганические соединения составляют важную часть фосфора почвы (от 20 до 80%) и превращаются в доступное для растений состояние при ферментативном гидролизе с отщеплением остатков фосфорной кислоты.

Активность фосфоргидролитических ферментов характеризует активность биохимических процессов мобилизации органического фосфора в почве. При определении фосфатазной активности в качестве субстрата используют моноэфиры фосфорной кислоты (фенолфталеин-фосфат натрия)

Ход анализа

На аналитических весах взить навеску воздушно-сухой почвы

(подготовительно для определения ферментов) 1 г. перенести в колбу на 50 мл. Прилить пипеткой 0,9 мл дистиллированной воды (увлажнить до 90%). Прилить пипеткой 1 мл 1%-ного раствора фенолфталеинфосфата натрия. Прибавить 3 капли толуола, закрыть корковой пробкой, взбалтывать на ротаторе 5 мин. Поставить в термостат на 1 ч при температуре 30°. Прилить цилиндром 45 мл дистиллированной воды и взбалтывать на ротаторе 5 мин. Отфильтровать через беззольный фильтр в мерную колбу на 50 мл. 20 мл фильтрата пипеткой перенести в пробирку, добавить 2 мл 10%-ного аммиака, перемешать. Окрашенный раствор колориметровать при зеленом свето-фильтре в кюветках шириной 5 мм.

Примечание. Если растворы бурые, добавить в колбу 1 мл насыщенного раствора алюмокалиевых квасцов.

Активность фосфатазы выражается в микрограммах P₂O₅ на 100 г почвы (ошибка определения до 5 %). Количество фенолфталеина, соответствующее взятому объему фильтрата, найти по графику. Стандартный раствор фенолфталеина: 0,01 г фенолфталеина растворить в 60 мл этилового спирта и объем довести до 100 мл. 1 мл этого раствора содержит 0,1 мг фенолфталеина. Для того чтобы перейти к выражению активности фосфатазы в микрограммах P₂O₅, надо использовать коэффициент 0,45, так как в субстрате одна молекула фенолфталеина связана с двумя молекулами фосфорной кислоты. Шкала стандартных растворов строится следующим образом: аликвоты образцового раствора, соответствующие 0,32; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 мг P₂O₅/50 мл, окрашиваются точно так же, как и испытуемые растворы, и просматриваются на фотоколориметре при зеленом светофильтре.

Рассчитывается активность фосфатазы (в мг P₂O₅/100 г почвы) по формуле

$$X = \frac{(a - b) \cdot P \cdot 0,45 \cdot 100}{H}$$

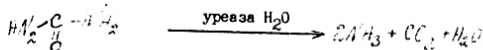
где *a* - количество фенолфталеина по графику опытного образца, мг; *b* - количество фенолфталеина по графику контрольного образца, мг; 0,45 - коэффициент перевода фенолфталеинфосфата натрия в P₂O₅; *H* - навеска почвы, г; 100 - пересчет на 100 г почвы.

Реактивы

1. 1%-ный раствор фенолфталеинфосфата натрия
2. 10%-ный водный водный аммиак.
3. Этиловый спирт-ректификат.
4. Насыщенный раствор алюмокалиевых квасцов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ
КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Уреаза катализирует гидролиз мочевины. Конечными продуктами гидролиза являются аммиак и углекислый газ



Мочевина в почву попадает в составе растительных остатков, навоза и как азотное удобрение. Она образуется и в самой почве в качестве продукта превращения азотистых органических соединений - белков и нуклеиновых кислот. Метод основан на учете аммиака, образующегося при гидролизе мочевины.

Ход анализа

Почву инкубируют в колбах с реактивами. Для этого в колбу на 50 мл взять 5 г почвы, добавить 10 мл фосфатного буфера (рН 6, 7), 10 мл 10%-ного раствора мочевины. Колбу закрыть корковой пробкой, встряхнуть и поставить в термостат при температуре 37° на 24 ч. Сначала на фильтр перенести только жидкость, затем в колбу добавить 15 мл 1 н раствора KCl, 5 мин встряхивать для вытеснения из почвы поглощенного аммиака и продолжать фильтрование, объем фильтрата довести до 50 мл. 10 мл фильтрата перенести в колбу для отгона аммиака по Кьельдалю (полумикроотгон). Прибавить 5 мл 2%-ного раствора щелочи, отгонять в течение 15 мин с момента кипения. Количество аммиака учитывается обратным титрованием 0,1 н. раствором KOH. Ошибка определения до 5%. По окончании инкубации в колбу добавить 15 мл 1,0 н раствора KCl и встряхивать в течение 5 мин для вытеснения из почвы аммиака. Содержимое колбы перенести в центрифужную пробирку и центрифугировать 5-10 мин при 3 тыс. об/мин или фильтровать через складчатый беззольный фильтр. Взять пипеткой 2-10 мл фильтрата (в зависимости от содержания аммиака) в мерную колбу на 50 мл, добавить до 30 мл дистиллированной воды, перемешать. Прибавить из бюретки 2 мл 50%-ного раствора калия-натрия виннокислого, перемешать. Прибавить из бюретки 20 мл реактива Насслера, перемешать, довести водой до метки, перемешать. Колориметрировать на фотоэлектрокolorиметре в кюветках шириной 20 мм с синим светофильтром (длина волны 400 нм)

Количество аммиака рассчитывается по предварительно составленной калибровочной кривой.

Стандартный раствор: 0,1 мг NH₃ в 1 мл воды.

Примечание. Дистиллированную воду необходимо проверять на содержание аммиака. Контроль - предварительно стерилизованная почва сухим жаром при 180° в течение 3 ч.

Активность уреазы выражается в миллиграммах NH₃ на 10 г почвы за сутки:

$$A_{NH_3} = \frac{(a - b) \cdot P \cdot 10}{H}$$

где a - количество аммиака по графику, мг; b - количество аммиака в контроле по графику, мг; H - навеска воздушно-сухой почвы, г; P - разведение.

Реактивы

1. 1 н KCl: 74,5 г хлористого калия растворить в дистиллированной воде и довести до 1 л.
2. Фосфатный буфер рН 6,7 11,876 г $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворить в дистиллированной воде и довести до 1 л 9,078 г KH_2PO_4 растворить в воде так же 400 мл раствора $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 600 мл раствора KH_2PO_4 , смешать.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Определение кремния (SiO_2)	5
Определение Fe_2O_3 в почве	8
Определение $MnCl$	12
Определение каталазной активности	15
Определение фосфатной активности	16
Определение уреазной активности колориметрическим методом	18

Методические указания к лабораторным работам по курсу "Биохимия почв" для студентов специальности "Биология"
Составитель Лазбенъ Владимир Ананьевич

Ответственный исполнитель В.А.Лазбенъ

Редактор Е.Ф.Зайцева

Подписано в печать 13.09.91. Формат 60x84 1/16.
Бумага писчая № 1. Печать офсетная. Усл.п.л. 1,4.
Уч.-изд.л.1,1. Тираж 30 экз. Заказ 114 Цена 14 р.
Отпечатано на ротапринте ГГУ им. Скорины, г.Гомель,
ул.Советская, 104

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ