

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего профессионального образования  
«Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

В.В. КОРОВКО, М.Ю. КАСАТКИН

# БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

*Рекомендовано учебно–методической комиссией и  
Учёным советом биологического факультета СГУ  
для студентов биологического факультета*

САРАТОВ  
2017

# Глава 1

## Методические указания по технике безопасности

### 1.1 Основные правила работы в лаборатории

К работе в лаборатории могут быть допущены студенты, прошедшие инструктаж по технике безопасности с соответствующей записью в специальном журнале. Студенты должны владеть навыками оказания первой помощи пострадавшим в результате несчастного случая. Перед работой нужно убедиться в наличии укомплектованной аптечки, инструментов, посуды, реактивов, исправности приборов. Категорически запрещено находиться в лаборатории без спецодежды. При необходимости могут быть использованы индивидуальные средства защиты органов дыхания, глаз, кожи рук.

Особое значение имеет организация рабочего места. Лабораторный стол нельзя загромождать посудой и приборами, на столе должно быть только то, что необходимо в данное время для выполнения опыта. Посуду и приборы следует держать в руках осторожно, не сжимая сильно пальцами. Химическую посуду нельзя резко ставить на стол, особенно, если он покрыт керамикой. Нюхать вещества нужно, не наклоняясь над сосудом и не вдыхая полной грудью, а только направляя к себе пары движением руки. Категорически запрещается пробовать что-либо на язык, набирать ртом при помощи пипетки или трубки ядовитые или едкие жидкости, пользоваться сотовым телефоном, принимать пищу в лаборатории. При работе с едкими веществами, мытье посуды, содержащей ядовитые вещества, нужно пользоваться резиновыми перчатками, прорезиненным фартуком, защитными очками. При приготовлении растворов кислот надо вливать кислоту в воду, а не наоборот, и пользоваться при этом толстостенной или фарфоровой посудой. Производя химические опыты, приборы следует располагать таким образом, чтобы реагирующие

вещества в случае разбрызгивания не могли попасть на самого экспериментатора или находящихся вблизи других лиц. Нельзя брать горячую посуду незащищёнными руками. Если на сосуде нет этикетки, пользоваться этим реактивом нельзя.

В доступном месте лаборатории должен висеть проверенный огнетушитель, а также должен быть ящик с песком. В случае возгорания деревянных предметов пожар можно тушить водой, песком и с помощью огнетушителя. Если горит нерастворимое в воде вещество (например: бензин, скипидар, масло и др.), то нельзя применять для тушения воду, потому что пожар не только не будет ликвидирован, но даже может увеличиться. Нерастворимые в воде органические вещества следует тушить песком или накрыванием полотёнцем. В случае возгорания проводов и электроприборов, находящихся под током, необходимо немедленно отключить источник тока и тушить огонь сухим углекислотным огнетушителем, сухим песком, покрывалом из асбеста. Если загорелась одежда, следует сначала погасить пламя, накинув на пострадавшего шерстяное или асбестовое одеяло, а затем снять с него одежду.

## 1.2 Первая медицинская помощь

При ожоге кислотами поражённый участок кожи быстро промыть большим количеством воды, затем обмыть 2%-ным раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , смазать обожженное место вазелином и перевязать бинтом. При ожогах щёлочью (кроме негашеной извести) — смыть водой, а затем 2%-ным раствором уксусной или борной кислоты, после этого смазать борным вазелином или 5%-ным  $\text{KMnO}_4$  и перевязать бинтом. При сильном ожоге пострадавшему дают обезболивающее средство. На обожженную поверхность накладывают стерильную повязку. Для местного лечения рекомендуются специальные аэрозоли («Пантенол» и др.).

При ожогах глаз — промыть 1%-ным раствором борной кислоты. При ожоге пищевода или желудка концентрированными растворами химикатов категорически запрещены попытки нейтрализовать реактивы соответствующими растворами кислот или щелочей, нельзя также самостоятельно промыть желудок. Следует немедленно вызвать врача.

При тепловом ожоге для прекращения воздействия температурного фактора необходимо быстрое охлаждение пораженного участка тела, затем надо смочить обожжённое место 5%-ным раствором  $\text{KMnO}_4$ , затем смазать мазью от ожогов, и перевязать бинтом.

При поражении электричеством отключить источник тока или устранить контакт при помощи резиновых перчаток или сухой деревянной палки.

## Первая помощь при кровотечениях, порезах

В случае пореза стеклом нужно вначале осмотреть ранку и извлечь из неё при помощи пинцета осколки стекла, если они есть, а затем обмыть пораненное место, смазать йодом и завязать бинтом или заклеить лейкопластырем. При носовом кровотечении посадить пострадавшего, голову наклонить вниз. Рекомендуются тампонирующие ноздри стерильным бинтом. Тампон закрепить при помощи пластыря. На переносицу наложить холодный компресс. При артериальном кровотечении ярко красная кровь бьет из раны пульсирующей струей. Чтобы прекратить кровотечение, артерию пережимают, при помощи жгута, который накладывают на бинт или вату выше места повреждения. Под жгут нужно положить записку с указанием времени наложения. В теплое время суток конечность не должна быть перетянута более 1–1,5 часов. При венозном кровотечении следует обработать кожу вокруг раны йодом, сделать давящую повязку: на рану наложить стерильную салфетку или бинт, сверху комок ваты, который туго прибинтовать к месту повреждения вены. При любых ранах, порезах запрещено прикасаться руками к ране, накладывать нестерильные материалы, листья растений, промывать водой, извлекать пальцами посторонние предметы. При незначительных порезах, царапинах обработать рану перекисью водорода, кожу вокруг раны смазать дезинфицирующим средством. При необходимости наложить повязку.

При пищевых отравлениях, симптомами которых являются тошнота, рвота, озноб, судороги, сонливость, необходимо промыть желудок. Дать больному активированный уголь (1 таблетка на 10 кг веса). Положить больного на бок, укрыть теплым одеялом. Запрещено вызывать рвоту при судорогах, заболеваниях сердца, бессознательном состоянии, при химическом отравлении.

## Глава 2

# Статистическая обработка результатов опытов

Для обработки результатов эксперимента широко применяют математические методы, которые позволяют точно характеризовать те или иные явления и выразить с помощью математических формул связи и зависимости между ними. При проведении экспериментов и научных наблюдениях возникает необходимость в выявлении таких закономерностей, которые обычно скрыты случайной формой своего проявления. Для надежности научных рекомендаций требуется определить достоверность результатов тех исследований, на основе которых даются рекомендации. Эти задачи решает математический анализ, использование достижений современной биометрии – науки о способах применения принципов и методов теории вероятности и математической статистики в биологии. Понимание и учет статистических закономерностей помогает экспериментатору составить методически обоснованный план опытов и правильно их провести. Знание основ биометрии необходимо на всех этапах эксперимента – от его планирования до интерпретации окончательных результатов.

Одна из основных задач статистической обработки экспериментальных данных – найти показатели, характеризующие особенности эмпирических совокупностей (групп) и дающие возможность сравнивать их друг с другом. Групповые свойства имеются в группах, но их нет у отдельных представителей. Группа начинается с двух объектов. Биометрия изучает средний уровень группы по любому измеряемому признаку. Два показателя характеризуют группы с достаточной определенностью: 1) среднее значение варьирующего признака и 2) показатель степени разнообразия (варьирования).

В биометрии различают: среднюю арифметическую –  $M$ , среднюю геометрическую –  $G$ , среднюю квадратичную –  $S$ , среднюю гармоническую –  $H$ , моду –  $M_0$ , медиану –  $Me$  и др. В зависимости от исследуемых объектов

и от поставленных целей возможны различные способы вычисления средней величины признака. Для того чтобы определить, какую из средних величин следует использовать в данном конкретном случае, надо знать их свойства. Основные характеристики средних величин: срединное расположение, абстрактность и единство суммарного действия.

Только абстрагируясь от индивидуальных разнообразных значений, можно характеризовать группу одним числом – средней величиной признака. Самая полная абстракция получается в тех случаях, когда средняя рассчитывается для всех объектов изучаемой совокупности. Если требуется учитывать одно или несколько условий, например возраст, физиологическое состояние растений и т. д., то среднюю величину определяют для отдельных частных групп. Чем больше этих групп, тем менее абстрактными становятся средние величины.

Средняя величина показывает, чему был бы равен изучаемый показатель, если бы все объекты группы были одинаковыми и сумма средних была такой же, как сумма полученных в эксперименте величин (единство суммарного действия).

Не всякое выравнивание различий в группе может привести к правильной средней величине. Средние величины надо вычислять таким образом, чтобы суммарное действие выровненных значений признака было бы равно суммарному действию полученных в эксперименте усредненных значений. Соблюдение принципа единства суммарного действия свидетельствует о правильности выбора той или иной средней. Если сумма усредненных значений не равна сумме первоначальных фактических значений, то это значит, что или средняя выбрана неправильно, или при расчетах были допущены ошибки.

Практически в большинстве биологических экспериментов достаточно считать среднюю арифметическую.

Среднюю арифметическую  $M$  можно вычислять во всех случаях по формуле:  $M = \frac{\sum V}{n}$ ; где  $\sum$  – символ суммирования,  $V$  – результат измерения признака у каждого объекта;  $n$  – объем группы или числа наблюдений в группе.

Средняя величина одним общим показателем характеризует всю группу в целом и поэтому совершенно не учитывает разнообразия объектов по изучаемому признаку.

## Глава 3

# Водный режим и минеральное питание

Для изучения водного режима и минерального питания растений можно выделить ряд задач, которые могут быть выполнены как последовательно (в рамках одного эксперимента), так и отдельно.

Можно рекомендовать следующие задачи:

- изучение поглощающей деятельности корневой системы в различных условиях минерального питания: а) поглощение воды; б) поглощение элементов минерального питания;
- изучение влияния условий минерального питания на рост и развитие растений;
- исследование влияния внешних условий на водный режим растений: а) поглощение воды корневой системой; б) транспирацию.

При последовательном выполнении задач эксперимент может быть проведен по следующей схеме. Следует начать с изучения влияния условий минерального питания на ранние этапы роста и развития растений. Варианты опыта: влияние сбалансированности раствора на прорастание семян; явление антагонизма ионов и др. Ликвидация опыта через 7–10 дней. Исследования: определение всхожести, фенологические наблюдения за проростками; количественный учет роста растений. Контрольные растения можно использовать для дальнейших опытов. Варианты следующих опытов: влияние состава, рН питательной смеси, выращивание растений на полной питательной смеси в темноте и на свету, изменения состава питательного раствора в различные сроки развития растений. Исследования: а) изучение влияния недостатка основных элементов минерального питания на рост и развитие растений; б)

влияние предварительных условий минерального питания на поглощение растворенных веществ; в) изучение поглощающей деятельности корневой системы растений методами химического анализа; г) влияние различных условий окружающей среды на процессы поглощения и испарения воды.

Прежде чем приступить к работе, необходимо составить план эксперимента, выбрать объекты исследования, определить количество растительного материала, необходимое для выполнения всей работы, подготовить список оборудования и реактивов, провести расчеты для приготовления растворов, освоить приборы, необходимые для работы, подготовить протоколы для регистрации наблюдений.

### 3.1 Вегетационный метод исследований

Успешная разработка проблемы минерального питания возможна лишь при дальнейшем расширении физиолого-биохимических исследований в направлении выявления новых элементов питания, эффективных форм удобрений, глубокого изучения их физиологической роли и др. Все это необходимо для сознательного управления обменом веществ, повышения продуктивности растений. Многие физиологические вопросы могут быть успешно решены лишь в вегетационных опытах с использованием почвенных, песчаных и водных культур. Выбор способа выращивания растений зависит от характера поставленной задачи. В физиологических исследованиях наиболее распространен метод водных культур. Почвенные культуры чаще используются для решения агрохимических задач, например изучения потребности в удобрениях. Принципиальное различие этих видов культур в системе питания. Источником питательных элементов в песчаных и водных культурах служат специальные питательные смеси. В настоящее время предложено и создается заново огромное количество питательных растворов. Их состав и свойства подбирают так, чтобы обеспечить оптимальные условия для выращивания отдельных видов растений и решения той или иной конкретной задачи.

**Выращивание растений в водных культурах** Метод водных культур открывает широчайшие возможности для изучения важнейших вопросов корневого питания растений. Проростки растений, выращенные в почве, мало пригодны для водных культур, так как даже при самом осторожном отмывании корней от приставших к ним почвенных частиц повреждение тонких корней, а тем более корневых волосков, неизбежно. Поэтому обычно выращивают растения из семян в условиях водных культур.

Зрелые семена растений для опыта тщательно отбирают по величине или

по весу. Перед замачиванием зерновок с помощью вакуумного насоса нужно удалить воздух. Затем семена в марлевых мешочках погружают в раствор марганцевокислого калия (1%) на 10 минут. Продезинфицированные семена помещают на фильтровальную бумагу в чашки Петри, доливают по 10 мл опытных растворов. Чашки Петри и кружки фильтровальной бумаги заранее необходимо простерилизовать при температуре 150°C в течение 2 часов. Перед закладкой семян чашки протереть спиртом.

Проращивание семян также возможно следующим способом. Какой-либо плоскодонный сосуд (например, половинку чашки Петри или низкий кристаллизатор) дном вверх помещают в другой, больший сосуд, на дно которого налита вода. Фильтровальную бумагу кладут таким образом, чтобы ее концы находились в воде, таким образом, она все время находится в умеренно увлажненном состоянии. Пинцетом на бумагу раскладывают семена правильными рядами, что дает возможность быстро подсчитывать количество проросших семян и следить за энергией прорастания. Если семена небольшие и достаточно быстро набухают (табак или горчица), то для устранения подсыхания наружный сосуд достаточно накрыть сверху стеклом, благодаря чему создается влажная камера (для аэрации оставляют небольшую щель). Крупные же семена с плотной оболочкой (кукуруза, горох, конопля) следует прикрыть сверху одним-двумя слоями влажной фильтровальной бумаги и концы бумаги спустить в воду. Семена для прорастания помещают при определенной температуре в темноту или на свет в зависимости от требований объекта.

После образования корня длиной 1,5 – 2 см растения следует перенести при помощи пинцета на низкие и широкие банки, заполненные питательным раствором или водой. В водной культуре крышка защищает поверхность питательного раствора от пыли и чрезмерного испарения. Крышки могут быть изготовлены из дерева, пропитанного воском, пластмассы, парафинированной марли. Для изготовления марлевой парафинированной крышки кусок марли (или другой белой, совершенно чистой материи) складывают в два-три слоя, погружают в расплавленный парафин с высокой точкой плавления (не ниже 50°) и затем быстро натягивают на края банки. После затвердевания парафина получается совершенно ровная и плотная крышка (края ткани обрезают). В крышке при помощи сложенного пинцета протыкают отверстия для корешков. Если необходимо держать растения в условиях водной культуры продолжительное время, то в марлевой крышке делают отверстия острым пробочным сверлом и в них вставляют низкие пробки; в каждой пробке сверлом меньшего размера делают отверстие для растения, которое укрепляют в нем негигроскопической ватой.

Выбор емкости для выращивания растений в водной культуре определя-

ется задачами исследования и видом растения. Это могут быть стеклянные или пластмассовые сосуды объемом от 0,5 до 3,5 л (обычно емкость 1–1,5 л достаточна). Для укрепления растений в горлышке и для предотвращения испарения питательного раствора можно применять различные приемы. В простейшем случае в тщательно подобранной плоской пробке делают пробочным сверлом два отверстия: одно посередине для растения, укрепляемого ватой, другое сбоку для подпорки, которой может служить гладко оструганная палочка.

Снаружи банку закрывают чехлом из двух слоев бумаги: черной внутри и белой снаружи. Для этого прямоугольный кусок бумаги сверху надрезают (сантиметра на 2) и, стягивая надрезанный край толстой ниткой, чехлу придают соответствующую банке форму цилиндра с загнутым к пробке краем. Под сосуд делают бумажный же поддонник, предотвращающий проникновение света снизу. Этим устраняется нагрев и действие света, который может вызвать развитие в растворе водорослей.

В условиях водных культур корни растения испытывают недостаток в кислороде. Аэрация раствора до известной степени обеспечивается продуванием через раствор воздуха. Для этой цели необходимо в крышке сосуда сделать специальное отверстие, через которое до дна сосуда опустить стеклянную трубку с оттянутым концом, соединенную с резиновой грушей или компрессором. Продувать воздух необходимо ежедневно не менее 15 минут. После продувания трубку вынимают и отверстие во избежание испарения раствора закрывают пробкой. При наличии системы тройников можно одновременно продувать несколько сосудов. При частой смене растворов (через 3–5 дней) обычно не возникает необходимости в специальных приемах обогащения раствора кислородом. Если в течение опыта необходимо извлекать растения из пробки, то в ней вырезают узкий сектор до среднего отверстия.

Вместо материальных банок часто применяют так называемые батарейные стаканы. Благодаря цилиндрической форме на них можно разместить несколько растений. Зачастую целесообразно выращивать на одном и том же сосуде большое количество растений (100 и больше). Для этого применяют крупные кристаллизаторы. Крышку для упомянутых широких сосудов делают из фанеры, в которой на определенном расстоянии высверлены или выжжены отверстия. Дерево обязательно тщательно парафинируют или покрывают слоем лака. Для поддержания растений служит проволочный каркас, закрепленный на крышке. В опытах с водными культурами необходимо следить за значением рН раствора, определяя его как перед сменой раствора (для учета сдвига), так и в свежем растворе, наливаемом в банки.

Когда образуются первые два настоящих листа у двудольных и два–три листа у однодольных, можно сделать окончательный отбор растений для

опыта, при этом необходимо руководствоваться состоянием как надземных частей, так и корневой системы проростков.

**Питательные растворы** Для успеха водной культуры выбор вполне подходящего питательного раствора чрезвычайно важен. Универсального раствора для всех растений нет, так как потребности растений к сочетанию ионов, осмотическому давлению и рН не совпадают. По набору питательных элементов отдельные наиболее часто используемые питательные растворы отличаются незначительно. В состав всех известных смесей входят N, P, K, Ca, Mg, S, Fe и основные микроэлементы (B, Mn, Cu, Zn, Mo). Смеси различаются по форме соединений, в виде которых вносятся питательные элементы, по величине рН, концентрации солей, содержанию микроэлементов и других дополнительных веществ, а также в ряде случаев по буферным свойствам. Основой рекомендуемых в литературе растворов являются  $Ca(NO_3)_2$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ , KCl и  $FeCl_3$ .

Набор солей макроэлементов в питательной смеси должен создавать условия, препятствующие значительным сдвигам реакции среды, нужную концентрацию всех элементов питания в доступной для растений форме, а также получение уравновешенного раствора. Первое требование обеспечивается подбором пар солей, которые тем или иным способом компенсируют друг друга в отношении их действия на рН раствора. Последнее достигается или частой сменой раствора или применением смесей, в состав которых входят буферные соли. Такими солями являются:  $Ca_3(PO_4)_2$  — предотвращающая подкисление раствора;  $Fe_2(SO_4)_3$  — предотвращающая подщелачивание раствора;  $Fe_3O_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $K_2HPO_4$  (в том или ином соотношении),  $KNO_3$ ,  $NH_4NO_3$  (в том или ином соотношении). Перечисленные буферные соли входят в состав смесей Прянишникова, Кроне, Цинцадзе и др.

Создание сбалансированных растворов — необходимое условие составления питательных смесей. Понятие «баланс питательных веществ» допускает известную широту дозировок и указывает на их определенное влияние, связанное с изменением содержания каждого отдельного элемента в растворе. Это свидетельствует о большом значении состава питательного раствора. Отсюда же возникает необходимость различать общее количество питательного элемента и его концентрацию. Считается, что оптимальный питательный раствор должен обеспечить наибольший урожай при наименьшей концентрации, повышение которой не дает никакого дальнейшего улучшения. Важно обеспечить растение всеми необходимыми элементами питания в концентрациях столь низких, чтобы они соответствовали скорости поглощения с учетом емкости сосудов, частоты смены растворов, стабильности рН и легкости диффузии в зоне корней.

Уравновешенным растворам свойственны определенные закономерности, характеризующие отношение концентраций катионов. Они могут быть установлены лишь после того, как будут учтены все возможные взаимодействия между компонентами смеси: аддитивность, синергизм и антагонизм. Величину отношения концентрации катионов в уравновешенных растворах в первую очередь определяет их валентность. С увеличением валентности относительная концентрация данного катиона в таких растворах падает. В то же время величина отношения концентраций катионов в уравновешенных растворах зависит от специфических особенностей. Известно, что способность уравновешивать токсическое действие возрастает значительно быстрее, чем валентность катиона. Например, валентность иона  $Ca^{2+}$  всего в 2 раза больше валентности иона  $Na^+$ , однако в антагонистических взаимодействиях ион  $Ca^{2+}$  оказывается в 100 раз более сильным. Принято считать, что солевые растворы для выращивания растений сбалансированы, если отношение концентраций одновалентных катионов к двухвалентным приблизительно равно 10 : 1.

Амплитуда осмотического давления в современных питательных растворах лежит в границах 0,4 – 1,0 атм. Верхний предел более приемлем в опытах с периодическим внесением солей и сравнительно ограниченным объемом сосудов, осмотическое давление питательного раствора не должно превышать 1,0 – 1,5 атм.

### **Приготовление исходных концентрированных растворов для питательных смесей**

При проведении вегетационного опыта с повторным приготовлением растворов рекомендуется приготовление концентрированных растворов солей на дистиллированной воде. Растворы соли железа лучше хранить в оранжевой бутылки и часто возобновлять. Для приготовления рабочего раствора берут определенное количество исходных растворов и разводят водой до нужного объема. Целесообразно готовить концентрированные растворы с таким расчетом, чтобы в 5 или 10 мл раствора заключалось количество соли, необходимое для 1 л питательной смеси.

Приведем пример расчета при приготовлении концентрированных растворов для раствора Кнопа. На каждый литр питательной смеси необходимо брать 1 г  $Ca(NO_3)_2$ , следовательно, 5 мл концентрированного раствора этой соли должны заключать в себе 1 г, а 1 л — 200 г. На 1 л питательной смеси требуется 0,25 г  $MgSO_4$ , следовательно, в 5 мл концентрированного раствора должно быть это количество соли, а в 1 л — 50 г. Соответственно, для  $KH_2PO_4$  также требуется 50 г соли на 1 л концентрированного раствора. На 1 л концентрированного раствора требуется 25 г  $KCl$  и 2,5 г  $FeCl_3$ . На этикетке бутылей пишется количество миллилитров концентрированного раствора, которое следует брать на 1 л питательной смеси (в нашем примере

5 мл).

При приготовлении раствора Кнопа необходимо соблюдать определенную последовательность внесения растворов солей в заготовленную для питательной смеси воду. Сначала вносят  $Ca(NO_3)_2$  и  $KCl$ , затем  $MgSO_4$ , далее (при помешивании) вводят  $KH_2PO_4$  и, наконец, соль железа. Указанный способ внесения сводит образование осадков к минимуму.

### Приготовление питательных растворов с исключением элементов

Значение отдельных элементов минерального питания для растений можно установить исключением данного элемента из состава питательной смеси при неизменной концентрации всех других. При удалении из раствора соли, содержащей исключаемый элемент, необходимо помнить, что остающийся в растворе элемент должен находиться в таком же количестве как и в полном растворе. Если используется раствор Кнопа, то при исключении калия вместо  $KH_2PO_4$  вносят  $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$  и вместо  $KCl - NaCl$ . Расчет проводят следующим образом. Содержание  $KH_2PO_4$  в литре полного раствора Кнопа составляет 0,25 г. Рассчитывают, сколько нужно  $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$  для того, чтобы содержание фосфора осталось неизменным. Количество фосфора в 0,25 г  $KH_2PO_4$  равно  $A = 0,25a/b$ , где  $a$  — атомный вес фосфора,  $b$  — молекулярный вес соли  $KH_2PO_4$ .

Необходимое количество  $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$  вычисляют по формуле:  $x = Ab/a$ , где  $A$  — количество фосфора, содержащееся в 0,25 г  $KH_2PO_4$ ,  $a$  — атомный вес фосфора,  $b$  — молекулярный вес соли  $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ . Следовательно, чтобы компенсировать фосфор, удаляемый при исключении калия в виде  $KH_2PO_4$ , на литр питательной смеси нужно взять  $x$  г  $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ .

Аналогично производят расчеты при замене других элементов. При исключении фосфора  $KH_2PO_4$  заменяют на  $KCl$ , при исключении азота —  $Ca(NO_3)_2$  заменяют на  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ .

## 3.2 Изучение поглощающей деятельности корневой системы

Рекомендуется исследования влияние состава, pH питательного раствора на поглощение корневой системой растений воды и растворенных веществ. Для изучения особенностей водного режима растений, в том числе и определения поглощения воды корневой системой, используют потометр. Растения, выращенные в водных культурах, помещают в потометр, содержащий, в зависимости от условий эксперимента, питательный раствор или воду. Такой

прибор позволяет изучать одновременно поглощение воды и минеральных элементов, измерить количество испаренной растением воды.

Самая простая модель потометра представляет собой цилиндр или материальную банку емкостью около литра. Цилиндр закрывается мягкой каучуковой пробкой, имеющей три отверстия. Через одно отверстие проходит толстостенная капиллярная трубка, изогнутая под прямым углом и заканчивающаяся сразу под пробкой. Через второе отверстие проходит стеклянная трубка, доходящая почти до дна цилиндра, в верхней части заканчивающаяся воронкой с одноходовым краном, которая служит для доливания воды в сосуд. В центре пробки делают третье отверстие, для растения, пробку разрезают по радиусу и через разрез вводят стебель растения. Стебель растения плотно зажимают в пробке. Пробку вставляют в цилиндр, наполненный кипяченной водой или раствором до краев. В цилиндре не должно быть пузырьков воздуха, капиллярная трубка должна быть заполнена водой. Для лучшей изоляции отверстия и разрез пробки заливают воском. К капиллярной трубке прикрепляют полоску миллиметровой бумаги.

При всасывании воды растением мениск жидкости в капилляре передвигается, о скорости всасывания судят по количеству делений, пройденных за определенные промежутки времени. Во время опыта нельзя допускать, чтобы мениск жидкости вышел за последнее деление. Возвращение мениска к исходному положению достигается приливанием воды из воронки. Для получения более точных результатов, рекомендуется использование потометра, капилляр которого располагают под небольшим углом (аналогично объемомеру, см. работу 3).

Для получения абсолютных значений исследуемых признаков, необходимо произвести калибровку капиллярной трубки, определив какому количеству воды или питательного раствора соответствует передвижение на одно деление.

Когда в целях исследования особенностей поглощения минеральных элементов, выращивание растений проводят в растильнях, необходимый учет количество поглощенной воды (или раствора) можно проводить следующим образом. Раствор наливают в сосуд до определенного уровня. Для этого поперек горлышка банки (или цилиндра) кладут деревянную перекладку с обращенным вниз острием посередине (в качестве последнего может служить игла или гвоздь). Раствор наливают всегда точно до тех пор, пока кончик острия не соприкоснется с его отражением (при неизменном положении сосуда точность 2—3 капли). Между пробкой и раствором всегда должно быть расстояние около 1 см; соприкосновения раствора с пробкой следует избегать. Количество поглощенной растением воды учитывают, доливая воду из мерной посуды (пипетки с делениями, бюретки или мерного цилиндра) до

прежнего уровня. Для этого растение вместе с пробкой (которая легко вынимается при поддевании сложенным пинцетом) переносят на пустую банку, на дно которой, во избежание подсыхания корней, наливают немного воды. После измерения количества поглощенной воды возможна замена раствора на свежий до уровня, после чего растение возвращают на прежнее место.

**Взятие пробы для определения поглощения ионов** Для определения поглощения растением того или иного иона необходимо знать:

1. объем питательного раствора, налитого в сосуд;
2. количество иона в данном объеме;
3. объем питательного раствора после пребывания на нем растения;
4. количество иона в оставшемся объеме раствора (которое и определяется анализом — работы 5–10);
5. по разности находят количество поглощенного иона, которое относится к единице времени.

Для определения необходимо правильно взять среднюю пробу; для этого растение вынимают вместе с пробкой из сосуда и несколько минут держат над сосудом, чтобы стекающие с корней капли раствора попадали обратно в сосуд. Затем растение переносят на банку, в которую налито немного воды, во избежание подсыхания корневой системы. Оставшийся в банке питательный раствор тщательно перемешивают стеклянной палочкой и переливают в мерный цилиндр для измерения объема. По разности объемов раствора узнают количество поглощенной растением воды. Затем точной пипеткой берут пробу для анализа в сухую колбу, плотно закрывают её пробкой и ставят до анализа в холодильник.

Если поглощение учитывают через короткие промежутки времени, то (во избежание ошибки в определении объема) раствор в опытном сосуде доводят до первоначального уровня дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Затем берут пробу. Учитывая химический состав питательного раствора в начале опыта и после пребывания растения в растворе в течение определенного времени, мы получим количественную характеристику динамики потребления растением элементов минерального питания.

### 3.2.1 Возможные варианты опыта

**Изучение влияния рН питательного раствора** Наряду с составом и осмотическим давлением питательного раствора рН последнего зачастую является фактором, определяющим развитие растений и физиологическую деятельность корневой системы.

Для изучения влияния рН раствора на поглощающую деятельность корневой системы, к полному питательному раствору добавляют  $H_2SO_4$  и  $NaOH$  в количестве, требуемом для получения определенных значений рН. Рекомендуется устанавливать разницу в значении рН не менее 1. Следует в начале опыта установить, какое количество миллилитров кислоты или щелочи необходимо прибавить к 1 л раствора чтобы получить требуемое схемой опыта рН. Эти количества фиксируются в дневнике и используются при повторном приготовлении раствора. Кислота и щелочь обычно употребляются в 0,2-нормальных растворах.

**Изучение влияния состава питательной смеси** Опыт рекомендуется поставить при различных условиях минерального питания (недостаток или полное исключение отдельных элементов из питательных растворов). Работу проводят с водной культурой растений. В качестве питательной смеси используется 0,1 (или 0,2) смеси Кнопа на водопроводной воде. В контрольном варианте растения выращивают на 0,1 (или 0,2) смеси Кнопа, в опытном — на том же фоне в зависимости от выбранной схемы могут быть снижены дозы минеральных элементов (0,5 или 0,2 от контроля), или полностью исключены из питательной смеси. Дозы вносимых дополнительно солей рассчитывают исходя из заданного в каждом отдельном случае содержания соответствующего элемента.

Растения, через 10–12 дней после высаживания на питательный раствор, используют в опытах по изучению поглотительной способности корневой системы.

Например, при изучении поглощения фосфора корневую систему растений помещают в 50 мл раствора, состоящего из смеси двух солей:  $KH_2PO_4$  и  $Ca(NO_3)_2$ . Фосфор вносят из расчета содержания  $PO_4^{3-}$  в 0,25 смеси Кнопа (44–50 мг/л).  $Ca(NO_3)_2$  используют для создания уравновешенного раствора, при этом дозу кальция подбирают так, чтобы отношение К:Са в растворе было около 10.

Перед началом опыта по поглощению корни растений 5–6 раз отмывают дистиллированной водой, подсушивают фильтровальной бумагой и только после этого помещают на питательный раствор. Продолжительность опыта 1,5–2 суток, по истечении которых в растворах (исходном и опытном) опре-

деляют содержание элемента одним из описанных далее методов. Перед этим растения вынимают из раствора, дают ему стечь с корней и затем доводят раствор дистиллированной водой до первоначального объема. Количество поглощенного элемента рассчитывают по разнице между содержанием элемента до и после опыта, на одно или какое-либо другое число растений за определенной время. Полученные данные используют для выводов.

**Изучение кинетики процесса поглощения элементов минерального питания корневой системой растения** В настоящее время многими исследователями принята гипотеза двойного механизма поглощения неорганических солей корнями растений. Первый механизм, как полагают, функционирует при низких концентрациях элементов: от 0,002 – 0,02 до 0,2 мМ; второй — включается при более высокой концентрации: от 0,2 – 0,5 до 30 – 50 мМ.

Кинетика процесса поглощения по первому механизму в точности повторяет кинетику ферментативных реакций, зависимость скорости абсорбции от концентрации катиона имеет вид гиперболы, уравнение которой повторяет известное уравнение Михаэлиса  $v = v_{max} \cdot c / K_m + c$ , где  $v$  — скорость поглощения данного катиона (в мкмоль на 1 г в 1 ч);  $v_{max}$  — максимальная скорость поглощения, определяемая как асимптота гиперболы;  $c$  — концентрация катиона (в мМ);  $K_m$  — константа Михаэлиса, численно равная концентрации катиона, при которой скорость реакции составляет половину максимальной.

Зависимость скорости поглощения от концентрации катиона при высоком его содержании в среде более сложная. Скорость абсорбции в этом случае достигает величин значительно больших, чем те, которые могут быть рассчитаны, исходя из уравнения Михаэлиса – Ментен.

В рекомендуемой задаче изучают поглощение элементов минерального питания корнями растений из растворов различной концентрации. Например, для изучения поглощения из растворов калия или кальция готовят две серии растворов, с концентрациями (мМ): 1) 0,02; 0,05; 0,07; 0,1; 0,13; 0,15; 0,18 и 0,20; 2) 0,5; 2, 5, 10, 20, 30, 40. При этом калий вносят в виде  $KCl$  в раствор 0,5 мМ по кальцию, кальций в виде  $CaCl_2$  в раствор 5 мМ по калию.

В растворы различных концентраций, разлитые по колбам, помещают по 10–20 растений. Объем раствора 50 мл. В опыте могут быть использованы растения, выращенные на питательной смеси с исключением отдельных элементов. После выдерживания растений на солях К или Са в течение 1,5 – 2 суток в растворе определяют содержание соответствующего элемента, используя методы, изложенные далее. По разности рассчитывают количество поглощенного катиона. Данные используют для характеристики процесса поглощения неорганических солей при низкой и высокой концентрации их в

среде.

Полученные результаты изображают графически, откладывая на оси ординат скорость абсорбции катиона при данной концентрации (в мкмолях) на определенное число растений (например, 10) в единицу времени (ч), а на оси абсцисс — концентрацию элемента (мМ). Пользуясь графиком, рассчитывают максимальную скорость поглощения, определяемую как асимптота гиперболы, константу Михаэлиса.

При изучении действия освещения контрольными являются растения, выращенные на полной питательной смеси на свету, опытные растения убирают в темноту.

Поглощение элементов из неуравновешенных растворов. Эта же задача может быть выполнена с использованием чистых солей, т. е. в условиях, когда катионы, взятые порознь, оказывают токсическое действие на растения. Например, в опыте можно применить те же концентрации  $KCl$  и  $CaCl_2$ . Цель его — изучить характер абсорбции растениями того или иного катиона из неуравновешенных растворов. Подобная постановка задачи позволит выявить специфику процесса поглощения этих двух катионов отдельно, и при антагонистических отношениях между ними.

### 3.3 Изучение влияния условий минерального питания на рост и развитие растений

Возможными вариантами опыта могут быть следующие: изучение влияния рН питательной смеси, состава питательной смеси (полная смесь и с исключением элементов), изменение состава питательного раствора в различные сроки развития растений (заложение опытов смотри выше), влияние неуравновешенных растворов солей на прорастание, рост и развитие растений (возможные схемы опытов приведены далее).

Для нормального роста и развития растений необходим уравновешенный: раствор, в котором все нужные для растения элементы находятся в определенном соотношении в силу различного действия их на протоплазму. Любая питательная соль, взятая в раствор, в отдельности действует ядовито, внесение в этот же раствор второй соли уже частично снимает токсическое действие первой. Это явление называется антагонизмом ионов. Опыты по антагонизму ионов удаются только в случае применения или химически чистых или перекристаллизованных реактивов.

Объектами могут быть отобранные по величине и весу семена, тщательно отобранные двухдневные проростки. В чашки Петри, содержащие по 10–15 мл опытных растворов, на фильтровальную бумагу помещают семена. Чашки

Петри закрывают крышками, для аэрации между стенкой чашки и крышкой вставляют кусочек сложенной в несколько слоев бумаги. Во избежание испарения раствора чашки Петри рекомендуется ставить под стеклянный колпак. Желательно варианты опыта ставить в трех повторностях ( $n = 40-50$  для семян,  $n = 20-30$  для проростков). Можно рекомендовать следующие схемы проведения опытов.

1. Антагонизм К и Са. Семена помещают на фильтровальную бумагу в чашки Петри. Тщательно отобранные двухдневные проростки высаживают в растильни. Опытные растворы: а)  $KCl$  — 0,5 г на 1 л; б)  $CaCl_2$  — 1,0 г на 1 л; в) смесь растворов  $KCl$  и  $CaCl_2$  в отношении 1:1.
2. Антагонизм К и Mg. Постановка опыта вполне аналогична предыдущему. Проростки культивируют на следующих растворах: а)  $K_2SO_4$  — 0,5 г на 1 л; б)  $MgSO_4$  — 0,3 г на 1 л, в) смесь растворов  $K_2SO_4$  и  $MgSO_4$  в отношении 1 : 1.
3. Антагонизм Са и Mg. Постановка опыта аналогична предшествующим. Готовят растворы: а)  $Ca(NO_3)_2$  — 8,2 г на 1 л; б)  $Mg(NO_3)_2$  — 3,7 г на 1 л; в) смесь  $Ca(NO_3)_2$  и  $Mg(NO_3)_2$  в отношении 1:1.
4. Проращивание семян в неуравновешенных растворах. Для проращивания семян и выращивание проростков используют 0,1-нормальные растворы солей. Варианты опыта (количества солей даны на литр раствора): 1)  $KCl$  — 7,40; 2)  $CaCl_2$  — 11,0 г; 3)  $NaCl$  — 5,8 г; 4)  $KCl + CaCl_2$  (1:1); 5)  $KCl + CaCl_2 + NaCl$  (1:1:1); 6) дистиллированная вода (контроль).

Длительность эксперимента 8–15 дней. По мере испарения раствора необходимо его доливать. При изучении влияния условий минерального питания на рост и развитие растений в течение опыта ведут и тщательно регистрируют наблюдения в журнале, указывая дату и время. Рекомендуется определить всхожесть (при проращивании семян), отмечая отклонения при проращивании семян и росте проростков (например, узловатость корней, отрицательный геотропизм и др.) (работа 1), провести количественный учет роста. Рекомендуются также наблюдения за состоянием конуса нарастания стебля. Сопоставить результаты опытные и контрольные, сделать соответствующие выводы.

### 3.3.1 Количественный учет роста растений

Показателем интенсивности роста могут служить линейное, весовое, объемное увеличение растения.

Интенсивность роста можно оценить по изменению линейных параметров, рассчитав значения скорости роста. Линейные параметры растений измеряют при помощи деревянной, гибкой миллиметровой линейки или рулетки. Высоту растения измеряют от корневой шейки до конца самой удаленной от начала промера части самого длинного листа или до вершины главного побега. Длину отдельных органов проводят также до самой удаленной их части. Длину корневой системы в целом определяют по самому длинному корню. Измерения проводят через определенные промежутки времени. На основании полученных данных определяют прирост в длину за каждый промежуток времени и строят кривую роста, откладывая по оси ординат прирост в сантиметрах или миллиметрах, а по оси абсцисс — промежутки времени, через которые проводились измерения. Абсолютную скорость роста органов растения определяют по формуле  $C = L_2 - L_1 / t_2 - t_1$ , где  $L_2$  и  $L_1$  — длина исследуемого органа или его части в моменты времени  $t_2$  и  $t_1$ . Определение относительной скорости роста проводят по формуле:  $V = [L_2 - L_1 / L_1 (t_2 - t_1)] \cdot 100 \%$ , где  $L_1$  и  $L_2$  — длина примордия, пластинки или влагалища в моменты времени  $t_1$  и  $t_2$ .

В качестве показателей интенсивности роста используют изменения сырого или сухого веса целого растения или его отдельных органов. При учете сырого веса целого растения взвешивание проводят немедленно после извлечения объектов из питательной смеси (воды); при измерении сырого веса отдельных частей — сразу после их срезания. Определение сухого веса проводят после высушивания растения до воздушно-сухого состояния. При точных анализах объекты высушивают в сушильном шкафу до абсолютно-сухого веса (работа 3). На основании полученных результатов составляют графики, отражающие динамику прироста сухого (или сырого) веса и делают соответствующие выводы.

При исследовании роста корневой системы показателем интенсивности роста может служить изменение объема корневой системы. Объем корневой системы определяют по вытесненному объёму воды в цилиндре при погружении в него корней (работа 3).

При ликвидации опыта по изучению влияния условий минерального питания на рост растений, рекомендуется учитывать длину корней, высоту наземной части, свежий вес проростков (наземной части и корневой системы), объем корневой системы, число и площадь листьев, абсолютно сухой вес наземной и подземной части растений. Также возможно определить корнеобес-

печенность проростков (работа 2), общую и рабочую поверхность корневой системы (работа 4), её поглотительную активность (работы 5–10).

### 3.4 Влияние внешних условий на водный режим растений

Водный режим растений складывается из процессов поглощения, проведения и испарения воды. Влияние условий минерального питания на поглощение воды корневой системой рассмотрено выше. Исследования влияния на интенсивность транспирации таких факторов, как рН питательной смеси, состава питательной смеси, изменение состава питательного раствора в различные сроки развития растений (заложение опытов смотри выше), можно дополнить следующими вариантами опыта: 1) влияние света и темноты, 3) влияние влажности атмосферы (прибор с растением помещают под стеклянный колпак, туда же ставят несколько кристаллизаторов с водой; кроме того, стенки колпака обтирают мокрой фильтровальной бумагой).

Рекомендуется определить интенсивность транспирации (работа 11,13), транспирационный коэффициент и продуктивность транспирации (работа 12), провести наблюдения за состоянием устьиц (работа 14).

### 3.5 Лабораторные работы по теме «Водный режим и минеральное питание растений»

#### Работа 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВСХОЖЕСТИ СЕМЯН

Всхожесть, как правило, определяют на 10 день после замачивания семян, как отношение количества проросших семян к общему, выраженное в процентах:  $A = B/C \cdot 100\%$ , где В — количество семян, проросших в опыте; С — общее количество семян. При изучении действия определенных факторов на всхожесть семян необходимо ввести поправку на всхожесть семян в контрольном варианте. Всхожесть в опытных вариантах ( $A_o$ ) рассчитывают по формуле:  $A_o = B/D \cdot 100\%$ , где В — количество семян, проросших в опыте; D — количество семян проросших в контроле.

#### Работа 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОРНЕОБЕСПЕЧЕННОСТИ ПРОРОСТКОВ

Материалы и оборудование: ножницы или скальпель, технические весы (точность до 0,01 г), бюксы с крышками, сушильный шкаф ( $t = 90-105^\circ \text{C}$ ).

Для выявления особенностей развития растений в различных условиях проводят сравнение морфометрических показателей развития корневой си-

стемы контрольных и экспериментальных растений. Отношение средних значений абсолютно сухой массы корневой системы к массе побега определяет корнеобеспеченность проростка, и может использоваться как показатель, характеризующий продуктивность растений.

Для определения накопления сухого вещества проростки каждого варианта опыта необходимо освободить от остатков эндосперма, отделить корневую систему от побега. Подготовленный таким образом растительный материал помещают в бюксы, плотно закрывают и взвешивают. После взвешивания бюксы открывают, помещают в сушильный шкаф при температуре 90 – 105° С минимум на полчаса, и затем досушивают при 105° С до постоянного веса. Постоянный вес устанавливается периодическим взвешиванием. Перед взвешиванием, вынутые из сушильного шкафа бюксы необходимо закрыть и охладить до температуры окружающей среды. Для того, чтобы найти сухой вес объекта, из результатов конечного взвешивания нужно вычесть вес пустого закрытого бюкса. Пустые бюксы взвешивают вместе с крышками с точностью до 0,01. Если по какой-то причине не удастся высушить объект до постоянного веса сразу, бюксы закрывают и досушивают позднее.

### Работа 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЪЁМА КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ (ПО САБИНИНУ И КОЛОСОВУ)

Материалы и оборудование: объёмомер, бюретка, вода.

В основу метода определения объема корней положено измерение вытесненной воды из цилиндра при погружении в него корней. Объёмомер представляет собой цилиндр, соединенный при помощи каучуковой трубки с градуированной капиллярной пипеткой или стеклянной трубкой. Внутренний диаметр пипетки составляет 2–3 мм. Стеклянная трубка закрепляется в зажиме штатива таким образом, чтобы её можно было закреплять под необходимым углом. Угол наклона зависит от требуемой чувствительности прибора. Чем меньше угол между трубкой и горизонтальной поверхностью, тем более чувствителен прибор. В цилиндр наливают воду, пипетку устанавливают на такой высоте, чтобы мениск воды показался у края градуированной части пипетки, обращенной к каучуковой трубке. Отмечают первоначальное положение мениска А1 пипетки, затем погружают корневую систему растения в цилиндр. Отмечают изменение положения мениска в цилиндре А2. Корневую систему извлекают из объёмомера и доливают воду в цилиндр до первоначального положения мениска А1. После этого, не меняя положение пипетки, приливают из бюретки воду до тех пор, пока мениск не достигнет положения А2. Объем воды, использованный для этого, соответствует объему корневой системы.

Аналогичным образом можно проводить измерение объема корневой си-

стемы при помощи потометра.

#### Работа 4. ИЗУЧЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ ОБЩЕЙ, НЕДЕЯТЕЛЬНОЙ И РАБОЧЕЙ ПОГЛОЩАЮЩЕЙ ПОВЕРХНОСТИ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ (по САБИНИНУ и КОЛОСОВУ)

Материалы и оборудование: 0,0003–нормальный раствор метиленовой сини, стаканы, стеклянные палочки, ФЭК, мерные пробирки или цилиндры объемом 10-15 мл.

Устойчивость и продуктивность растений определяются в значительной степени мощностью корневой системы. Одним из показателей мощности развития корней является их объем. Физиологическая активность корневой системы во многом обусловлена соотношением активной и неактивной поверхности корневой системы. Установлено, что у более продуктивных растений формируется большая общая поверхность корней, и что особенно важно, с большим отношением рабочей поглощающей поверхности к неактивной части корневой системы.

Определение указанных показателей играет немалую роль в выяснении условий питания растений и в разработке рациональной системы их питания. Кроме того, путем сравнения величин поверхностей корней у разных сортов и гибридов можно выделить наиболее перспективные для конкретных условий среды.

Порядок выполнения работы.

1. Определение объема корневой системы. Берут 10-15 опытных растений, связывают их в снопок. Лишнюю воду с корней удаляют с помощью фильтровальной бумаги. Измеряют объем корневой системы с помощью объемера.

2. Определение площади поверхности корневой системы. В 3 стакана наливают 0,0003 н раствор метиленовой синьки в количестве, превышающем в 10 раз объем корней опытных растений. Затем последовательно погружают корни в стаканы с краской на 1,5 минуты в каждый. После каждого погружения раствору синьки дают стечь в стакан, затем корни осторожно отжимают влажной фильтровальной бумагой. Опытные растворы перемешивают стеклянной палочкой в целях создания равномерности растворов.

За время пребывания корней в растворе краски адсорбируется и поглощается определенная часть синьки. Поглощение метиленовой синьки учитывают по изменению концентрации наружного раствора путем колориметрирования. Определяют, таким образом, поглощение краски в каждом стакане и выражают в мг. Затем определяют все показатели поверхности корневой системы.

Общая адсорбирующая поверхность корней выражается в квадратных метрах и рассчитывается путем умножения 1,05 на количество мг поглощен-

ной метиленовой синьки за два первых погружения, т. е. в первых двух стаканах (1 мг метиленовой синьки покрывает площадь  $1,05 \text{ м}^2$  при мономолекулярной адсорбции). При этом получается несколько завышенная величина адсорбирующей поверхности, так как при втором погружении некоторое количество краски проникает уже внутрь клеток корней.

Рабочая поглощающая поверхность корней в квадратных метрах рассчитывается умножением  $1,05$  на количество мг краски, поглощенной при третьем погружении, т. е. в третьем стакане. При первых двух погружениях вся поверхность корней адсорбировала краску. При третьем погружении убыль краски в растворе происходила за счет поглощения её внутрь клеток корней. На это способны лишь деятельные части корневой системы.

Недеятельная поверхность корней вычисляется по разности между общей и рабочей поглощающей поверхностями корневой системы.

Оба раствора метиленовой синьки (опытный и образцовый) приготавливают непосредственно перед определением поверхности корней.

На основании полученных данных делают выводы о характере влияния разных условий на формирование общей, деятельной и недеятельной поверхности корней.

Изучение поглощающей деятельности корневой системы растений методами химического анализа

#### Работа 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТОВ ДИСУЛЬФОФЕНОЛОВОЙ КИСЛОТЫ (МЕТОД ГРАНВАЛЬ-ЛЯЖУ)

Принцип метода. Метод основан на приобретении раствором нитрата желтой окраски при действии дисульфифеноловой кислоты.

Материалы и оборудование: фарфоровая чашка, водяная баня, стеклянный колпак, стеклянная палочка, мерные колбы емкостью 50 или 100 мл, дистиллированная вода, ФЭК, дисульфифеноловая кислота, серная кислота, 14-% аммиак, химически чистый  $KNO_3$ , стеклянная посуда для приготовления реактивов.

Приготовление реактивов:

1. Дисульфифеноловая кислота. 3 г чистого кристаллического фенола смешивают с 37 г (20,1 мл) серной кислоты (уд. вес 1,84) и нагревают 6 часов при  $100^\circ \text{C}$ , помещая неплотно закрытую склянку в кипящую воду. Приготовленный таким образом реактив в холодное время может выкристаллизовываться; для перевода его в раствор прибегают к нагреванию; прибавления воды надо избегать.

2. Аммиак (уд. веса 0,9, 28-%) разбавляется наполовину водой (до уд. веса 0,945, соответствующего 14%).

3. Образцовый раствор нитрата. 0,1631 г химически чистого сухого  $KNO_3$

растворяют в воде и доводят до 1 л; берут 100 мл этого крепкого раствора и доливают водой до 1 л; последний раствор является образцовым и содержит 0,01 мг  $NO_3$  в 1 мл.

Ход анализа.

Испытуемый раствор по содержанию нитратов должен быть близок к образцовому раствору. В случае большей концентрации испытуемый раствор до выпаривания разбавляют.

Для анализа берут 10 мл испытуемого раствора и выпаривают досуха на водяной бане в фарфоровой чашке (лучше пользоваться плоскодонными чашками, так как в них раствор выпаривается быстрее). После выпаривания раствора чашке дают остыть. Если анализ переносится на следующий день, чашки закрывают стеклом или ставят под стеклянный колпак. Затем прибавляют 1 мл дисульфифеноловой кислоты и тщательно размешивают закругленным концом стеклянной палочки так, чтобы капли растеклись по всему дну чашки. Через 10 минут приливают 10 мл воды и нейтрализуют содержимое чашки 14-% раствором аммиака до появления неизменяющейся желтой окраски раствора (вместо аммиака возможно использовать 10-12% КОН или NaOH). Окрашенные растворы переносят в мерные колбы емкостью 50 или 100 мл. Чашки споласкивают несколько раз небольшими порциями дистиллированной воды, которые выливают в колбочку, и раствор доводят до метки.

Раствор перемешивают и сравнивают в фотоэлектроколориметре с образцовым раствором, обработанным таким же образом. Желтая окраска раствора связана с образованием нитросоединения.

Если в растворе имеется аммиак в большом количестве, то его до определения удаляют отгонкой. Если имеются солянокислые соли в значительном количестве, то хлор удаляют прибавлением сернокислового серебра, не содержащего азотной кислоты. Если определение нитратов ведется в растворе, на котором пребывало растение, то рекомендуется произвести параллельное количественное определение нитритов, которые могут образоваться за счет редукции нитратов.

Результаты анализа вычисляют по формуле:  $x = abc/de$ , где:  $a$  – титр образцового раствора (мг  $NO_3$  в 1 мл);  $b$  – количество образцового раствора (мл), взятое для выпаривания;  $c$  – высота (отсчет) образцового раствора в колориметре;  $d$  – высота (отсчет) испытуемого раствора в колориметре;  $e$  – количество испытуемого раствора (мл), взятое для выпаривания.

Найденное количество нитратов будет заключаться в 1 мл испытуемого раствора. Если желательнее вычислить не  $NO_3$ , а N, то результат анализа умножают на коэффициент 0,226.

## Работа 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРИТОВ ПО МЕТОДУ ГРИССА

Принцип метода. Метод основан на приобретении раствором, содержащим нитриты, красной окраски при действии реактива Грисса, состоящего из нафтиламинсульфокислоты, растворенной в уксусной кислоте. Реактив Грисса крайне чувствителен к ничтожным количествам нитритов в растворе. Он применим в присутствии глюкозы, пептона и ряда других органических соединений.

Материалы и оборудование: стеклянная посуда для приготовления реактивов, мерная колба (объем 100 мл), дистиллированная вода, сульфаниловая кислота, уксусная кислота,  $\alpha$ -нафтиламин, хлопчатобумажная ткань для процеживания уксуснокислого раствора  $\alpha$ -нафтиламина, цинковая пыль, ФЭК.

Приготовление реактивов.

1. Раствор сульфаниловой кислоты. 0,5 г химически чистой сульфаниловой кислоты растворяют в 100 мл уксусной кислоты уд. веса 1,04.

2. Уксуснокислый раствор  $\alpha$ -нафтиламина. 0,1 г  $\alpha$ -нафтиламина кипятят с 20 мл воды и процеживают в 180 мл уксусной кислоты уд. веса 1,04, через хорошо промытую хлопчатобумажную ткань.

3. Нитритный реактив. Смешивают равные объемы растворов 1 и 2. Смесь готовить в небольших количествах, лучше перед каждым анализом. Если при смешении реактивов появится красная окраска, нужно прибавить к раствору цинковой пыли, хорошо взболтать и отфильтровать.

4. Образцовый раствор азотистокислого натрия. 0,1499 г  $NaNO_2$ , два раза перекристаллизованного и просушенного до постоянного веса при  $85^\circ$ , растворяют в 1 л воды, 1 мл раствора содержит 0,1 мг  $NO_2$ . Берут 100 мл этого раствора и доводят до 1 л. Последний раствор является образцовым и содержит 0,01 мг  $NO_2$  в 1 мл.

Ход анализа.

Для определения берут 80 мл испытуемого раствора, прибавляют 8 мл нитритного реактива и объем доводят до 100 мл. Одновременно готовят образцовый раствор для колориметрирования. Для этого к 1 мл образцового раствора прибавляют 8 мл нитритного реактива и объем доводят до 100 мл. Раствор содержит 0,0001 мг  $NO_2$  в 1 мл (или 0,00003 мг N).

## Работа 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АММИАКА РЕАКТИВОМ НЕССЛЕРА

Принцип метода. Реактив Нesslerа состоит из двойной соли йодистой ртути и йодистого калия ( $HgJ_2 \cdot 2KJ$ ), растворенной в растворе КОН. Аммиак с реактивом Нesslerа дает соединение — йодистый меркураммоний, которое при малых количествах аммиака в растворе окрашивает его в желтый цвет, при значительных — в красно-желтый:



Материалы и оборудование: фарфоровая чашка для выпаривания, стеклянная палочка, стеклянная посуда для приготовления реактивов, дистиллированная вода, серная кислота, 50% раствор сегнетовой соли, 20% раствор едкого калия или натрия, реактив Несслера, хлористый аммоний, ФЭК.

Приготовление реактивов.

1. Вода без аммиака получается вторичной перегонкой лабораторной дистиллированной воды, слабо подкисленной серной кислотой. Для колориметрических определений эту воду можно приготовить быстро, прибавив соды к лабораторной дистиллированной воде до слабощелочной реакции и выпарив около 1/4 объема. Свободная от  $NH_3$  вода идет на приготовление всех последующих реактивов;

2. Реактив Несслера. Раствор хлорной ртути (17 г в 300 мл) вливают в раствор йодистого калия (35 г в 100 мл), пока красный осадок йодистой ртути не перестанет растворяться; тогда раствор доводят до 1 л 20-процентным раствором едкой щелочи и опять прибавляют раствор хлорной ртути, пока не появится исчезающий осадок; раствор оставляют стоять до полного просветления и хранят в плотно закрывающейся склянке. Цвет его должен быть светло-желтым; если же он бесцветен, то нужно прибавить хлорной ртути. Время от времени чувствительность реактива нужно проверять сильно разбавленным раствором хлористого аммония. Реактив хранится в темноте.

3. Образцовый раствор хлористого аммония. Растворяют в воде 0,7405 г чистого  $NH_4Cl$  и доводят до 1 л; 10 мл этого крепкого раствора разбавляют водой до 500 мл; этот образцовый раствор содержит 0,005 мг  $NH_4$  (или 0,0047  $NH_3$ ) в 1 мл.

4. Образцовый колориметрический раствор. 10 мл реактива 5 разбавляют водой приблизительно до 90 мл, прибавляют 4 мл реактива Несслера и доливают водой до 100 мл. Раствор этот готовят одновременно с приготовлением испытуемого раствора; он содержит одну часть  $NH_4$  на два миллиона. Образцовый колориметрический раствор иной крепости готовится подобным же образом, причем всегда 100 мл его должны содержать 4 мл реактива Несслера.

Ход анализа.

Наличие в испытуемом растворе солей кальция и магния мешает колориметрическому определению аммиака реактивом Несслера, так как они образуют осадок от КОН, содержащегося в реактиве Несслера. Необходимо устранить вредное действие упомянутых солей. Последнее достигается прибавлением к испытуемому раствору перед внесением в него реактива Несслера 1–2 мл 50-процентного водного раствора сегнетовой соли. Соль эта не мешает определению аммиака и вместе с тем удерживает Са и Mg в растворе.

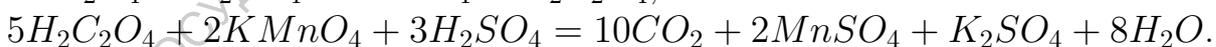
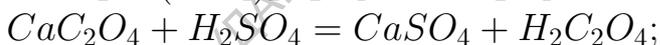
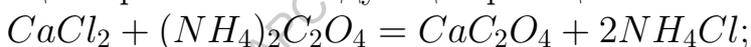
Если испытуемый раствор бесцветен и не содержит солей, препятствующих реакции, то определение ведут без предварительной перегонки; в противном же случае определенное количество раствора доводят до иголочной реакции содой и перегоняют в приемник с дистиллированной водой.

Приступая к определению, необходимо приблизительно установить концентрацию испытуемого раствора, для чего к нескольким миллилитрам его в пробирке прибавляют реактив Несслера. Если получится осадок, раствор нужно разбавить и снова испробовать небольшое его количество. Цвет раствора должен быть желтый, светлого оттенка; если цвет темно-желтый или красноватый, то это значит, что раствор слишком концентрированный.

Для определения аммиака на основании описанной выше разведки берут определенный объем испытуемой жидкости, доводят водой без аммиака приблизительно до 40 мл, прибавляют 1–2 мл сегнетовой соли и 2 мл реактива Несслера и объем доводят до 50 мл. В это же время готовят образцовый колориметрический раствор и через 15 минут сравнивают эти растворы в фотоэлектрокolorиметре.

#### Работа 8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ ОБЪЕМНЫМ МЕТОДОМ

Принцип метода. Кальций из уксуснокислого раствора осаждается щавелевокислым аммонием (в растворе которого щавелевокислый магний легко растворим и поэтому остается в растворе), образовавшийся осадок растворяется серной кислотой, в результате реакции освобождается щавелевая кислота в количестве, эквивалентном находящемуся в осадке кальцию. Щавелевую кислоту оттитровывают перманганатом и по количеству израсходованного раствора узнают, сколько кальция содержалось в растворе. При определении кальция протекают следующие реакции:



Материалы и оборудование: фарфоровая чашка для выпаривания, водяная баня, стеклянная палочка, предметное стекло, стеклянная посуда для приготовления реактивов, дистиллированная вода, водяная баня, термометр, фильтр из плотной фильтровальной бумаги, воронки, 4-% раствор щавелевокислого аммония, крепкая уксусная кислота, 3-% раствор азотнокислого серебра, азотная кислота, 1-% раствор серной кислоты, 10-% раствор серной кислоты, 0,05-нормальный раствор перманганата калия.

Приготовление реактивов. 1. 3-% раствор  $AgNO_3$ , подкисленный азотной кислотой (3 г азотнокислого серебра растворяют в дистиллированной воде и прибавляют 5 мл 0,5-нормального раствора  $HNO_3$ , объем доводят до 100 мл).

2. 0,05-нормальный раствор перманганата. Отвешивают 1,5805 г  $n_4$ , растворяют в дистиллированной воде, объем раствора доводят до литра. Проверяют титр после того, как приготовленный раствор перманганата две недели постоит в закрытой бутылки в темном месте.

Ход анализа. Для анализа берут 20–25 мл предварительно подкисленного уксусной кислотой раствора, содержащего кальций, и к кипящему раствору приливают 5–10 мл (в зависимости от предполагаемого количества кальция) насыщенного раствора щавелевокислого аммония. Для подкисления раствора необходимо использовать только уксусную кислоту, так как при наличии ее в растворе кальций легко отделяется от магния; оксалат кальция нерастворим, а оксалат магния легко растворяется в уксусной кислоте. Кроме того, из слабой кислоты кальций осаждается полнее.

Затем раствор с осадком ставят в теплое место (50–60°) на 4 часа. По истечении этого срока проверяют полноту осаждения кальция. Для этого каплю прозрачного раствора над осадком стеклянной палочкой переносят на стекло и к ней прибавляют каплю слабого раствора хлористого кальция. Если появляется белый осадок (что указывает на избыток осадителя), осаждение кальция можно считать законченным. В противном случае раствор с осадком опять подогревают и добавляют в него по каплям еще 5 мл осадителя (реактив 2), после чего вновь ставят в теплое место на 4 часа.

После проверки на полноту осаждения осадок промывают. Для этого используют беззольный фильтр из плотной фильтровальной бумаги, который смачивают дистиллированной водой и плотно пригоняют к внутренним стенкам воронки. Затем раствор фильтруют. Оксалат кальция тщательно собирают со стенок стакана (в котором проводилось осаждение) стеклянной палочкой с резиновым наконечником, а затем смывают на фильтр горячей дистиллированной водой, содержащей несколько кристалликов щавелевокислого аммония, чтобы избежать даже ничтожного растворения осадка.

Стакан и осадок промывают небольшими порциями этой воды до тех пор, пока в промывных водах не перестанет обнаруживаться муть от прибавления азотнокислого серебра, подкисленного азотной кислотой (проба на хлор). Затем промывают горячей дистиллированной водой, не содержащей щавелевокислого аммония, до удаления последнего, о чем судят по отсутствию мути при прибавлении к промывным водам азотнокислого серебра, не подкисленного азотной кислотой. Азотная кислота искажает результаты пробы, так как в ее присутствии щавелевокислое серебро растворимо, тогда как в воде оно дает муть.

При промывании осадка необходимо помнить, чтобы воды было не более 2/3 объема фильтра, так как осадок оксалата кальция легко теряется, если вода доходит до края фильтра. Нужно также проверить, не осталось

ли в промывных водах кристалликов оксалата кальция, для чего стакан с промывными водами быстро вращают и, если в центре образуется муть, то промывные воды необходимо снова профильтровать.

После промывания осадка под воронку с фильтром подставляют стакан, в котором проводилось осаждение кальция, и осадок на фильтре растворяют горячим 1-% раствором серной кислоты. Серную кислоту приливают на фильтр небольшими порциями до полного исчезновения осадка. После этого воронку с фильтром удаляют и в стакан приливают 5 мл 10-% раствора серной кислоты.

Содержимое стакана нагревают почти до кипения и затем титруют 0,05-нормальным раствором перманганата калия до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение минуты. Затем фильтр бросают в стакан; если при этом жидкость обесцветится, ее вновь оттитровывают перманганатом. Вычисление результатов. 1 мл 0,05-нормального раствора перманганата соответствует 1 мг кальция. Поэтому число миллилитров этого раствора, израсходованного на титрование щавелевой кислоты, будет соответствовать числу миллиграммов кальция во взятом объеме.

Определение титра раствора перманганата

Для установления титра раствора перманганата используют чистую перекристаллизованную щавелевую кислоту, щавелевокислый натрий, или аммоний безупречной чистоты. Взятую с большой точностью навеску 0,20–0,25 г растворяют в 5–100 мл дистиллированной воды в хорошо промытой хромовой смесью, а затем дистиллированной водой фарфоровой чашке, приливают 1–2 мл концентрированной серной кислоты и нагревают раствор в чашке на водяной бане до 60–80°, помешивая термометром.

Поддерживая температуру бани, из бюретки приливают раствор перманганата (5 г  $n_4$ , растворенных в литре прокипяченной горячей воды) до появления розовой окраски. Если окраска держится в течение 2 минут, титрование считают законченным. При указанных навесках раствора перманганата идет около 22 мл. В темноте или в хорошо закрытой бутылки оранжевого стекла раствор перманганата может храниться без изменения титра неограниченное время.

Вычисление титра перманганата по кислороду. Две молекулы  $KMnO_4$  в кислой среде выделяют 5 атомов кислорода, которые идут на окисление 5 молекул щавелевокислого натрия, или на одну молекулу  $(COONa)_2$  идет один атом кислорода. Расчет ведут по формуле  $x = ma/(bv)$ , где  $m$  – навеска щавелевой кислоты или щавелевокислого натрия,  $b$  – молекулярный вес молекулы щавелевой кислоты или щавелевокислого натрия;  $a$  – атомный вес кислорода;  $b$  – молекулярный вес молекулы;  $v$  – объем раствора перманганата, пошедший на титрование. Расхождение между титрами, полученными при титровании

разных по весу навесок, допускается только в пятом знаке.

### Работа 9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАГНИЯ ОБЪЕМНЫМ МЕТОДОМ

Материалы и оборудование: фарфоровая чашка для выпаривания, водяная баня, стеклянная палочка, лакмусовой бумажки, плотный фильтр, вакуумный насос, воронка, химический стакан, электроплитка, стеклянная посуда для приготовления реактивов, дистиллированная вода, водяная баня, 10-% соляной кислоты, 10-% двухзамещенный фосфорнокислый натрий, 10-% раствор аммиака, 2,5-% раствор аммиака, 3-% раствор азотнокислого серебра, 0,1-нормальная соляная кислота, метилоранж, азотная кислота.

Приготовление реактивов.

1. 3-% раствор азотнокислого серебра, подкисленный азотной кислотой (см. работу 8).

2. 0,1-нормальная соляная кислота. В литре 0,1- нормального раствора должно содержаться  $36,46/10 = 3,646$  г кислоты. Для приготовления необходимо знать удельный вес концентрированной кислоты. Рассчитываем, какой объем соляной кислоты с уд.весом 1,19 нужно, чтобы получить 0,1 –нормальный раствор. Соляная кислота с уд. весом 1,19 содержит 37,23% чистой кислоты. Для получения литра 0,1–нормального раствора нужно  $3,646 \cdot 100/37,23 = 9,7945$  г, а в единицах объема  $9,7945/1,19 = 8,23$  мл. Отмеривают из бюретки необходимое количество кислоты, разбавляют её до литра в мерной колбе и, титруя щелочью с индикатором метилоранжем (или фенолфталеином) проверяют нормальность. Если раствор получился более концентрированным, чем требуется, к нему добавляют воду. Например, установлено, что 1 мл раствора содержит не 0,0037, а 0,0039 г кислоты. Следовательно, нужно взять не литр воды, а  $1000 \cdot 3,9/3,7 = 1054,1$  мл, то есть добавить 54,1 мл. При этом необходимо учесть объем раствора, использованный для титрования (v). Количество воды, которое необходимо добавить в приведенном примере равно  $54,1 - (54,1 \cdot 0,001v)$ .

3. Метилоранж. Используют 0,1-% водный раствор метилоранжа.

Ход анализа. При определении магния надо предварительно удалить кальций. Вследствие этого определение магния лучше всего вести в фильтрате с промывными водами, полученными при определении оксалата кальция. Фильтрат и промывные воды сгущают до объема 25–30 мл.

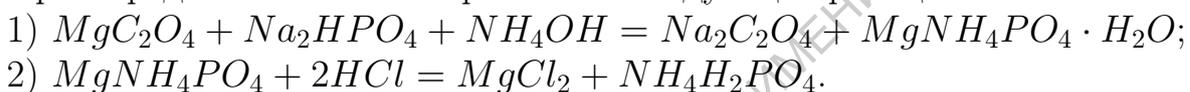
25–30 мл сгущенного раствора, содержащего оксалат магния, подкисляют 10-процентным раствором соляной кислоты до покраснения лакмусовой бумажки. После этого для осаждения магния приливают 15 мл 10-процентного раствора двухзамещенного фосфата натрия. Затем жидкость нагревают до кипения и прибавляют 10-процентный раствор аммиака в количестве, отвечающем 1/3 объема раствора. В результате реакции выпадает кристаллический

осадок аммонийно-магниевого фосфата.

Если осадок не кристаллический, его растворяют прибавлением соляной кислоты и снова осаждают. После 5–6-часового выдерживания на холоде осадок отфильтровывают через плотный фильтр (синяя обложка) и промывают 2,5-процентным раствором аммиака, вначале декантацией, а затем осадок переносят на фильтр. Отмывание ведут до отрицательной реакции на хлор с азотнокислым серебром. Фильтр заполняют раствором не более чем на 2/3 ввиду того, что осадок всплывает вверх. Затем осадок для удаления аммиака промывают спиртом и для удаления спирта высушивают вместе с воронкой и фильтром при 50–60° в течение часа.

Просушенный осадок вместе с фильтром переносят в стакан, где велось осаждение магния, добавляют 20–40 мл дистиллированной воды и титруют 0,1-нормальной соляной кислотой с метилоранжем в качестве индикатора.

При определении магния протекают следующие реакции:



1 мл точно 0,1-нормальной соляной кислоты соответствует 1,206 мг магния. Поэтому число миллилитров израсходованной на титрование соляной кислоты будет соответствовать числу миллиграммов магния во взятом объеме.

#### Работа 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛИЯ КОБАЛЬТ-НИТРИТНЫМ МЕТОДОМ

Принцип метода. Калий осаждается из раствора кобальт-нитритом натрия; выпавший осадок отмывают от избытка реактива и примесей и растворяют перманганатом в присутствии серной кислоты. По количеству перманганата, необходимого для растворения осадка, судят о количестве калия, образовавшего комплексную соль.

Нерастворимость осадка в воде (1:20000), чувствительность к незначительным количествам калия, индифферентность реактива к другим ионам и простота манипуляции делают метод чрезвычайно пригодным для определения калия в питательных растворах.

Материалы и оборудование: фарфоровая чашка для выпаривания, водяная баня, стеклянная палочка, стеклянная посуда для приготовления реактивов, дистиллированная вода, азотнокислый кобальт, ледяная уксусная кислота, азотнокислый натрий, 10-% уксусная кислота, 2,5-% раствор сульфата натрия ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), 0,01-нормальный раствор перманганат калия, серная кислота, 0,01-нормальный раствор щавелевой кислоты, оплавленная стеклянная палочка, шоттовская воронка №4, вакуумный насос, фильтровальная бумага, химический стакан.

Приготовление реактивов.

1. Кобальт-нитрит натрия: а) 25 г азотнокислого кобальта  $Co(NO_3)_2$  растворяют в 50 мл дистиллированной воды и прибавляют 12,5 мл ледяной уксусной кислоты; б) 120 г азотнокислого натрия  $NaNO_2$  растворяют при осторожном нагревании в 180 мл дистиллированной воды. За день до употребления 1 часть реактива «а» смешивают с тремя частями реактива «б», через смесь в течение 1–2 часов продувают воздух (для удаления окислов азота). Смесь оставляют стоять 5 часов. После этого выпавший осадок удаляют фильтрованием; при хранении в прохладном месте раствор годен к употреблению 3–4 дня, на льду — 2–3 недели.

2. Разбавленная серная кислота (на 7 частей дистиллированной воды берут 1 часть концентрированной серной кислоты).

3. 0,01-нормальный раствор щавелевой кислоты (аналогично расчетам в работе 10).

Все реактивы проверяют на чистоту от калия. Указанное количество реактивов берут при наличии в 5 мл раствора от 0,02 до 0,05 г соли калия, при меньшем количестве соли количество реактивов необходимо соответственно уменьшать.

Ход анализа. 20 мл испытуемого раствора помещают в фарфоровую чашку, которую нагревают на водяной бане до 80–90°. Раствор сгущают выпариванием до объема 1–2 мл. Затем по каплям приливают 5 мл кобальт-нитрита натрия и раствор выпаривают (при той же температуре), помешивая оплавленной стеклянной палочкой до сиропообразной консистенции. Чашку охлаждают, приливают 1,5 мл 10-процентной уксусной кислоты, содержимое чашки тщательно растирают, затем приливают 5 мл дистиллированной воды и осадок фильтруют через шоттовскую воронку №4 при разрежении (в начале слабо).

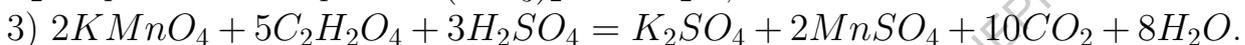
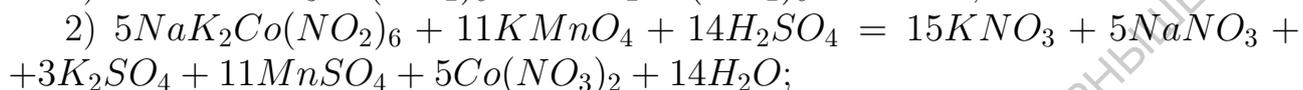
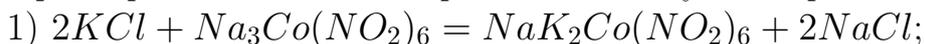
Осадок промывают дистиллированной водой, а затем раствором сернокислого натрия, в котором образовавшийся осадок трудно растворим. Отмывание осадка прекращают, когда стекающий фильтрат станет бесцветным.

В химический стакан наливают 125 мл дистиллированной воды; 50 мл раствора перманганата и нагревают до 80° на кипящей водяной бане. Затем в раствор опускают воронку с осадком, осторожно помешивая стеклянной палочкой (2–3 минуты), после чего в стакан добавляют 5–8 мл серной кислоты. Продолжая нагревание, тщательно следят за растворением осадка; нагревают стакан до тех пор, пока не исчезнет желтый осадок. Жидкость в стакане должна все время оставаться фиолетовой, при обесцвечивании ее приливают 1–2 мл раствора перманганата (количество которого записывают), так как обесцвечивание раствора указывает на недостаток перманганата. После растворения осадка к горячему раствору приливают раствор щавелевой кислоты до тех пор, пока черный осадок перекиси марганца, появляющийся при раз-

рушении комплексной соли, не исчезнет и раствор не обесцветится. Избыток щавелевой кислоты оттитровывают перманганатом до исчезающей розовой окраски.

Разница в количестве миллилитров взятых растворов перманганата и щавелевой кислоты дает количество миллилитров раствора перманганата, затраченного на разрушение осадка, содержащего калий.

При определении калия протекают следующие реакции:



Из приведенных реакций видно, что при разрушении перманганатом осадка комплексной соли калия-натрия кобальт-нитрита 30 молекул  $NO_2$  окисляются до  $NO_3$ . Необходимые для этого 60 окислительных эквивалентов получают частью из перманганата (каждая молекула которого, распадаясь, освобождает 5 окислительных эквивалентов, этих молекул в реакции участвовало 11, следовательно, при распаде перманганата получается 55 эквивалентов), частью при переходе ионов трехвалентного кобальта в двухвалентный (5 окислительных эквивалентов). Серная кислота служит только для подкисления раствора.

Расчет результатов. 1 мл 0,1-нормального раствора перманганата окисляет такое количество калия-натрия кобальт-нитрита, которое соответствует 0,0856 мг  $K_2O$ , или 0,071 мг калия. Вычитая количество щавелевой кислоты, потраченной на титрование оставшегося неизрасходованным перманганата, из общего количества истраченного  $n_4$  и помножив разность на 0,071 мг, получим количество калия, содержащегося в 20 мл испытуемого раствора:

$x = 0,071 (a - b)$ , где  $a$  – общее количество перманганата,  $b$  – количество щавелевой кислоты.

## Работа 11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ТРАНСПИРАЦИИ

Материалы и оборудование: кристаллизатор, весы, вода.

Относительной транспирацией называется отношение интенсивности транспирации к интенсивности испарения со свободной водной поверхности. Для определения относительной транспирации, надо найти интенсивность испарения со свободной водной поверхности. В небольшой кристаллизатор до половины наливают воду, взвешивают с точностью до второго знака и ставят в те же условия, в которых определяется интенсивность транспирации. Через определенный промежуток времени взвешивают вторично. Изменение в весе покажет количество испаренной воды. Расчет интенсивности испарения производится по формуле:  $E = 100(a_1 - b_1) / v_1 \tau_1$

где:  $a_1$  — вес кристаллизатора с водой до опыта,

$b_1$  — то же, после опыта,

$v_1$  — площадь кристаллизатора,

$t_1$  — продолжительность опыта в часах.

Относительную транспирацию рассчитать как отношение интенсивности транспирации к интенсивности испарения со свободной поверхности.

Полученная величина показывает, что интенсивность транспирации достаточно велика, несмотря на то, что выделение водяного пара происходит в основном только через устьица, суммарная площадь которых составляет примерно 1% площади листа. Последнее указывает на приложимость к диффузии газов через устьица закона Стефана, согласно которому диффузия газов через маленькие отверстия идет не пропорционально площади, а пропорционально их диаметру.

## Работа 12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРАНСПИРАЦИОННОГО КОЭФФИЦИЕНТА И ПРОДУКТИВНОСТИ ТРАНСПИРАЦИИ

Материалы и оборудование: весы, сушильный шкаф (90–100°С), бюксы.

Важными характеристиками водного режима растений являются продуктивность транспирации, как количество органического вещества в граммах, которое образуется на 1 кг испаренной воды, и транспирационный коэффициент, представляющий собой величину, обратную первой, т. е. количество граммов воды, которое растение должно пропустить через себя, чтобы накопить 1 г сухого вещества. Для одного и того же растения отношение между величиной урожая и количеством потраченной воды не является постоянным и может сильно колебаться в зависимости от условий (в частности, от минерального питания).

Обе величины могут быть определены в результате наблюдений над транспирацией растения в течение более или менее значительного промежутка времени. При постоянстве внешних условий обе величины в первую очередь определяются свойствами растений и служат для их физиологической характеристики.

Растения выращивают в вегетационных сосудах, защищенных от испарения воды, или для контроля берут сосуды, подготовленные во всех отношениях наравне с опытными, но без растений; сосуды ежедневно взвешивают.

В конце опыта суммируют все количество потребленной воды и учитывают урожай, т. е. количество накопленного органического вещества, причем для точности необходимо собирать все опавшие за время опыта листья, а в конце опыта тщательно отмыть корневую систему. Недостаточно ограничиться определением воздушно-сухого веса только наземной части. Необходимо относить количество воды к абсолютно сухому весу, принимая при этом

во внимание действительно всю массу органического вещества, накопленную растением. Для вычисления на абсолютно сухой вес нет никакой нужды высушивать весь материал при  $100^{\circ}$  до постоянного веса – достаточно взять часть его в воздушно-сухом состоянии, определить в нем количество гигроскопической воды и пересчитать на всю воздушно-сухую массу.

Продуктивность транспирации определяют как отношение накопленной массы, выраженной в граммах на количество испаренной воды, выраженной в килограммах. Транспирационный коэффициент, характеризующий потребность растения в воде, рассчитывают, разделив вес испаренной воды (г) на вес урожая (г).

### Работа 13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИСПАРЯЮЩЕЙ ПОВЕРХНОСТИ

Материалы и оборудование: ножницы, листы бумаги, стойкий карандаш, гибкая миллиметровая линейка, деревянная линейка и нитка, весы.

Определение испаряющей поверхности типичного листа.

На листе бумаги вычерчивают и вырезают квадрат со сторонами 10 см. Взвешивают его и находят вес бумаги площадью  $100\text{см}^2$ . На фрагмент такой же бумаги накладывают листовую пластинку, обводят ее контуры. Контур вырезают и взвешивают. Получают вес бумаги, площадь которой соответствует площади листовой пластинки. Составляют пропорцию.

$100\text{ см}^2 \dots \text{вес } a$

$X\text{ см}^2 \dots \text{вес } b$

$X = 100 \cdot b/a$ , где  $x$  — искомая площадь поверхности объекта,  $a$  — вес бумажного квадрата,  $b$  — вес контура листа, вырезанного из бумаги.

Определение испаряющей поверхности хвои.

Один грамм сырой хвои соответствует поверхности в  $33\text{ см}^2$ .

Определение испаряющей поверхности листовых черешков, побегов, веток.

Объект разбивают мысленно на участки, одинаковые по толщине. Определяют поверхность каждого как боковую поверхность цилиндра (произведение высоты на длину окружности). Измерение длины окружности можно проводить при помощи полоски миллиметровой бумаги, или нитки. Нитку оборачивают вокруг объекта, отмечая на ней длину одного оборота, после чего определяют длину окружности, прикладывая ее к линейке. Общую поверхность объекта определяют как сумму поверхностей всех участков.

### Работа 14. ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ УСТЬИЦ (по Молишу)

Материалы и оборудование: пипетки тонкие или стеклянные палочки, бензол, абсолютный спирт (другие жидкости, различающиеся по вязкости — керосин, ксилол, эфир).

Преимущество данного метода заключается в возможности изучения объекта в полевых условиях не нарушая его целостность. В основе метода способности жидкостей, обладающих различной вязкостью, проникать через малые отверстия. Спирт, имеющий большую вязкость, проникает через широко раскрытые устьица. Бензол, как менее вязкий, способен проникать в слабо раскрытые устьица. Вместо бензола и спирта можно брать и другие жидкости, различающиеся по вязкости — керосин, ксилол, эфир.

Ход работы. Не отделяя лист от растения, на его абаксиальную сторону наносят стеклянной палочкой (или пипеткой) по капле бензола и абсолютного спирта. Для нанесения реактивов лучше выбрать два соседних участка, разделенных главной жилкой. Наблюдения за проникновением жидкостей через устьичные щели необходимо проводить немедленно, при этом смотреть через листовую пластину на свет.

В том случае, когда устьица широко раскрыты, капли спирта и бензола быстро проникают через устьичные щели, заполняют межклетники и на листе появляются прозрачные пятна. Если устьица приоткрыты, образуется пятно только в месте нанесения бензола. Это объясняется тем, что бензол, обладающий небольшой вязкостью, с большей легкостью проходит через узкие отверстия. В случае, когда устьица закрыты, капли реактивов, оставаясь на поверхности листа, испарятся, не оставив следа. Результаты наблюдений отметить в таблице. Проникновение вещества отмечать «+». Таким образом, применяя одновременно или последовательно обе жидкости, можно определить степень раскрытия устьичной щели.

# Глава 4

## Фотосинтез

### 4.1 Характеристика пигментных систем фотосинтетического аппарата

Важнейшими компонентами фотосинтетического аппарата являются пигменты, при помощи которых фотосинтезирующие организмы улавливают электромагнитную энергию солнечного света и преобразуют ее в химическую энергию органических (неорганических) соединений. Пигменты подразделяются на три группы химических веществ: хлорофиллы, каротиноиды и фикобилины.

Хлорофиллы являются сложными эфирами дикарбоновой хлорофиллиновой кислоты  $C_{32}H_{30}ON_4Mg(COOH)_2$  и двух спиртов — фитола ( $C_{20}H_{39}OH$ ) и метанола ( $CH_3OH$ ).

В настоящее время известно 10 различных модификаций хлорофилла и бактериохлорофилла, которые отличаются друг от друга характером и расположением радикалов у  $\beta$ -углеродных атомов пирольных колец, в то время как основная часть остается неизменной: циклическая 18-членная система сопряженных связей, центральный атом магния, циклопентановое кольцо, фитол (у бактериохлорофиллов «с» и «d» – фарнезол). Все фотосинтезирующие организмы, за исключением пурпурных и зеленых бактерий, обладают хлорофиллом «а». У синезеленых водорослей этот хлорофилл единственный, но в качестве дополнительного пигмента они содержат фикоцианин. Для других групп растений характерны дополнительные хлорофиллы. Так, например, хлорофилл «b» присутствует в фотосинтетическом аппарате высших растений, зеленых и эвгленовых водорослей, хлорофилл «с» – у бурых и диатомовых водорослей, хлорофилл «d» обнаружен у красных водорослей.

К каротиноидам относятся бескислородные желто-оранжевые пигменты — каротины — с общей формулой  $C_{40}H_{56}$  и ксантофиллы ( $C_{40}H_{56}O_2$ ) золотисто-

желтого цвета, содержащие кислород в форме гидрокси- или эпокси- групп. Это полиизопреноиды, центральная часть молекул которых состоит из 18 атомов углерода и представляет собой систему сопряженных двойных связей. Каротиноиды присутствуют в мембранах у всех фотосинтезирующих организмов. При этом высшие растения имеют довольно стабильный набор желтых пигментов, который включает бициклические каротиноиды, А- и В-каротины и их производные: лютеин, зеаксантин, виолаксантин, антраксантин, неоксантин и др. Среди водорослей нет такого единообразия по составу каротиноидов и каждый класс имеет свой специфический набор. Исключение составляют зеленые водоросли, которые содержат те же основные каротиноиды, что и высшие растения.

Фикобилины — это дополнительные специфические пигменты красных и синезеленых водорослей, имеющие тетрапиррольную незамкнутую структуру. Наиболее известные представители фикобилинов — фикоэритрины и фикоцианины. Первые преобладают у красных водорослей и определяют их цвет, вторые — у синезеленых.

В дальнейшем мы будем рассматривать лишь пигменты, характерные для высших растений: хлорофиллы и каротиноиды.

#### Работа 1. ЭКСТРАКЦИЯ ПИГМЕНТОВ ИЗ ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЕВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Введение. В зависимости от цели исследования пигменты можно экстрагировать из свежего или фиксированного растительного материала. В последнем случае надежным способом фиксации служит замораживание тканей с последующей лиофилизацией (лиофильная сушка). Недопустимо фиксирование растительного материала сухим жаром в сушильном шкафу, поскольку постепенное повышение температуры сопровождается усилением гидролитических процессов, и в том числе гидролиза хлорофилла. Фиксированные листья помещают в эксикатор и хранят в темном и прохладном месте. При работе с сухим материалом берут 80 %-й раствор ацетона или 96 %-й — этилового спирта (вода в растворителях необходима для гидролиза связей пигментов с белком).

При выборе экстрагирующих веществ следует учитывать не только то, какой материал используется, свежий или фиксированный, но еще и такие факты как растворимость и возможность выделения пигментов данным растворителем из пигментно-липо-протеидного комплексов, в составе которых они находятся в пластидах. Так, например, хлорофиллы и каротиноиды, являясь в основном липофильными соединениями, хорошо растворяются в растворяющих липиды соединениях (спирт, ацетон, бензин и др.). Однако ввиду того, что пигменты связаны с липопротеидами, их полное извлечение воз-

можно лишь при использовании полярных (спирты, ацетон) растворителей или смеси в различных соотношениях полярных и неполярных (петролейный эфир, гексан, бензин и другие) растворителей в зависимости от цели исследований. Дело в том, что полярные растворители, вызывая денатурацию белка и нарушая связи пигментов с липопротеидным комплексом, обеспечивают быструю экстракцию всех пигментов, чего нельзя сказать о чистых неполярных растворителях. Поэтому чистые неполярные растворители экстрагируют в нормальных условиях только каротин, часть ксантофиллов и лишь 1 – 5 % хлорофиллов. Для полной экстракции пигментов неполярными растворителями необходима примесь полярного растворителя (2-3 % этанола в петролейном эфире, например).

Существует много способов экстракции пигментов из растительного материала. Выбор одного из них зависит от задачи исследования и объекта. В данной лабораторной работе, во-первых, приводится один из наиболее распространенных способов экстракции, позволяющий экстрагировать все пигменты одновременно, а затем уже, при необходимости, можно производить разделение на отдельные компоненты, переводя пигменты в неполярные растворители; во-вторых, предлагается убедиться в том, что хлорофилл лучше всего экстрагируется из растительного материала полярными растворителями, нежели растворами, содержащими в различных соотношениях полярные и неполярные растворители; в-третьих, работа позволяет научиться получать экстракты каротиноидов из навески зеленых листьев, не прибегая к разделению пигментов в двух несмешивающихся жидкостях.

### **Экстракция пигментов полярными растворителями**

Материалы и оборудование: Свежие или сухие листья исследуемого растения, этиловый спирт или ацетон, соль  $CaCO_3$  (соль  $MgCO_3$ , 10 %-й  $NH_4OH$ ), кварцевый песок, фильтровальная бумага, ступка с пестиком, стеклянный фильтр с колбой Бунзена, стеклянная палочка, стеклянные градуированные центрифужные пробирки с каучуковыми пробками, мерные цилиндры на 25 мл, стеклянные пипетки на 10 мл, штатив для пробирок, штатив для пипеток, дозатор, ножницы, насос Камовского или водоструйный насос.

Ход работы. Удалите крупные жилки и черешки в исследуемом материале, взвесьте 0,1-0,2 г свежих листьев (размер навески зависит от цели опыта). Навеску листьев измельчите ножницами, поместите в фарфоровую ступку и разотрите со стеклянным или кварцевым песком (для разрушения клеточных оболочек), предварительно добавив небольшое количество мела ( $CaCO_3$ ) или  $NH_4OH$  (для нейтрализации клеточного сока) и 4 мл спирта (ацетона). Растирание материала в ступке проводите до получения однородной массы в течение 5 мин. Затем содержимое ступки перенесите на пористый стеклянный фильтр № 3, вставленный в колбу Бунзена с подключенным водоструйным на-

сосом (или насосом Камовского). Для ускорения фильтрации на стеклянный фильтр предварительно необходимо положить фильтровальную бумагу. Приливая небольшие порции растворителя, экстракцию проводите до получения бесцветной капли. При этом на фильтре остается серая однородная масса без видимых признаков присутствия пигментов. Полученный экстракт, если он оказался мутным, отфильтруйте повторно через фильтр №2. Измерьте объем полученной вытяжки.

Примечание. Часто применяют предварительную экстракцию 40 – 50 %-м ацетоном. При этом удаляется большое количество водорастворимых веществ (антоцианы, флавоны, органические кислоты) без потерь исследуемых пигментов, что облегчает дальнейшее извлечение пигментов чистым ацетоном и приостанавливает действие некоторых ферментных систем. Рекомендуется вместо абсолютного ацетона использовать 80 %-й во избежание его глубокого денатурирующего действия на пигмент-белковый комплекс, что затрудняет экстракцию.

### **Перевод пигментов из ацетонового (спиртового) экстракта в другие растворители**

В практической работе весьма часто необходимо иметь растворы пигментов в этиловом, серном или петролейном эфирах. Например, для нанесения пигментов на хроматографическую бумагу используют эфирные экстракты, поскольку эфиры быстро испаряются, и бумага под их действием не размокает. С этой целью осуществляют перевод пигментов из одних растворителей в другие, так как растирание растительного материала в этиловом эфире затруднено в силу высокой летучести и легкой воспламеняемости этого растворителя. В то же время петролейный эфир, будучи неполярным и гидрофобным, лишь незначительно экстрагирует пигменты из живой ткани. При этом растворы пигментов в этиловом, серном или петролейном эфирах, гексане и других неполярных растворителях готовят на основании спиртового или ацетонового экстрактов.

Материалы и оборудование. Ацетоновый, спиртовой экстракты фотосинтетических пигментов, петролейный эфир, насыщенный раствор NaCl, дистиллированная вода, химический стакан на 200 – 250 мл, делительная воронка, стеклянные пипетки на 1 – 2 мл, штатив для пипеток, дозатор.

Ход работы. Ацетоновый (спиртовой) экстракт пигментов объемом 5 мл перенесите в делительную воронку (рис. 2) и добавьте равный объем нужного эфира. При этом общее количество вносимых в делительную воронку жидкостей не должно занимать более 1/3 ее объема. Затем осторожно по стенке воронки прилейте воду (или насыщенный раствор NaCl, применяемый во избежание образования эмульсии между слоями в ходе разделения), пока не образуется два слоя. Нижний, бесцветный водно-ацетоновый (спир-

товой) слой удалите. Верхний, эфирный, содержащий пигменты, промойте несколько раз водой для удаления следов ацетона (спирта).

В ходе опыта замерьте количество воды (NaCl раствора), ушедшее на перевод пигментов из одного растворителя в другой, исключая воду, ушедшую на промывку.

**ВНИМАНИЕ!** Работа проводится под вытяжкой в хорошо проветриваемом помещении.

### **Экстракция каротиноидов из зеленых листьев растений**

Каротиноиды можно извлекать из растительного материала, не применяя разделение пигментов смеси в двух несмешивающихся жидкостях. Для этого используется двухэтапная экстракция: сначала каротины, хорошо растворимые в неполярных растворителях извлекаются бензином низких и высоких фракций или петролейным эфиром, а затем ксантофилл вместе с хлорофиллом — этиловым спиртом или ацетоном. При этом неполярный растворитель не должен содержать следов спирта или ацетона, поскольку любые количества поверхностно активных веществ способствуют переходу хлорофилла в раствор.

Однако прежде чем приступить к экстракции необходимо произвести обезвоживание взвешенной порции листьев. Для этого последние растираются в ступке с сернокислым натрием. Количество сернокислого натрия, необходимое для растирания одной порции, зависит как от величины навески исследуемого растительного материала, так и от содержания в ней воды. Опыт показывает, что избыток сернокислого натрия не действует на ход анализа, поэтому нет необходимости брать его точно по весу. Достаточно, чтобы его количество примерно в 10 – 20 раз превышало величину навески.

Растирание материала производится тщательно в течение 10 – 15 мин. При плохо растертом материале затягивается время извлечения и снижается точность анализа.

При проведении экстракции каротиноидов описываемым способом надо помнить, что ступка и пестик должны быть совершенно сухими. Если ступка влажная, то сернокислый натрий прилипает к стенке ступки так плотно, что его почти невозможно отделить.

Материалы и оборудование. Листья зеленых растений, сернокислый натрий, бензин или петролейный эфир, соль гидроксида калия или натрия, этиловый спирт, ацетон, фильтровальная бумага, фарфоровая чашка с пестиком, стеклянные центрифужные градуированные пробирки, колба Бунзена, стеклянная палочка, воронка со стеклянным фильтром, химические стаканы, колба на 100 мл со шлифом с притертой крышкой, штатив для пробирок, широкий шпатель, анатомический пинцет, ножницы, насос.

Ход работы. Взвесьте 0,4 г листьев и разотрите их в фарфоровой ступке

с серноокислым натрием следующим образом. Около половины необходимого количества серноокислого натрия высыпьте в ступку, сверху положите взятую навеску, которую засыпьте оставшимся количеством реактива. Предварительно взятую навеску немного разомните, то есть постучите по ней пестиком несколько раз сверху вниз. Это делается для того, чтобы основное количество воды, содержащейся в листе, сразу поглотилось серноокислым натрием и тем самым создались условия, затрудняющие действие ферментов. Затем растирайте растительный материал равномерно, не прилагая большой силы и постоянно помешивая содержимое ступки до получения однородного, сухого, легко сыпучего порошка светло-зеленого цвета.

Приготовленный таким образом порошок подвергните обработке бензином (или петролейным эфиром) одним из предложенных ниже способов.

Первый способ. Налейте неполярный растворитель (4-5 мл) в ступку с порошком. Получившуюся кашу ярко-зеленого цвета растирайте 2-3 мин, после чего к ней прибавьте еще 20 мл растворителя и растирайте еще 1-2 мин. Бензин (петролейный эфир) удалите декантацией (сливанием жидкости с отстоявшегося осадка). Операцию повторите несколько раз до тех пор, пока приливаемый растворитель не перестанет окрашиваться. Обычно после 3-4 раз раствор бензина (петролейный эфир) уже бесцветен. Все экстракты соберите воедино, объем измерьте.

Второй способ. Порошок перенесите в воронку со стеклянным фильтром (рис. 1), предварительно положив на фильтр фильтровальную бумагу. Затем в воронку внесите 5 мл бензина (петролейного эфира). Полученную кашу перемешайте стеклянной палочкой. Затем прибавьте еще несколько миллилитров бензина (петролейного эфира) и после нескольких минут настаивания экстрагируйте до тех пор, пока последние капли неполярного растворителя не будут бесцветны. Все экстракты соберите воедино, объем измерьте.

После извлечения каротина в материале остались связанные с липопротеидным комплексом хлорофилл и сумма ксантофиллов: лютеин, виолаксантин и неоксантин. Для извлечения этих пигментов сделайте следующее.

Если извлечение каротина производилось в ступке, то к оставшемуся материалу прибавьте 10 мл ацетона со спиртом (3:1) и растирайте его в течение 2-3 мин. Раствор декантируйте и к остатку добавьте новую порцию растворителя. Извлечение повторяйте до обесцвечивания материала. Если обработка порошка производилась бензином (петролейным эфиром) на фильтре, к остатку после извлечения каротина прилейте несколько миллилитров спиртового ацетона и, помешивая стеклянной палочкой, дайте настояться в течение нескольких минут. Затем при легком отсасывании извлеките оставшиеся пигменты. Эту операцию повторите 2-3 раза до полного обесцвечивания серноокислого натрия.

Присутствие в растворе ксантофиллов не мешает определению хлорофилла. Определение же суммы ксантофиллов может быть произведено лишь после того, как от них будет отделен хлорофилл. Для этого возьмите кусочек твердого едкого калия (около 1 г) и поместите в небольшую сухую колбочку. Туда же прилейте порцию спиртово-ацетоновой вытяжки, предназначенную для омыления и закройте пробкой во избежание испарения растворителя. Омыление проводите 20 мин в темноте при встряхивании. При омылении образуются калиевые соли хлоринов, растворимые в воде. После омыления в колбочку прилейте несколько миллилитров бензина (петролейного эфира) и слейте тройную смесь (спирт-бензин-ацетон) в делительную воронку. Затем в колбочку снова прилейте 4-5 мл бензина (петролейного эфира) для того, чтобы сполоснуть щелочь, и эту порцию прилейте к раствору в делительной воронке. К смеси растворителей добавьте 1-2 мл воды и воронку сильно встряхните. Происходит быстрое расслоение без образования эмульсий. Верхний бензиновый (петролейно-эфирный) слой содержит ксантофиллы, а нижний водно-спиртово-ацетоновый содержит соли хлоринов.

Отделите нижний слой и повторите операцию по извлечению ксантофиллов. Для этого прибавьте к водно-спиртово-ацетоновой фракции 4-5 мл бензина (петролейного эфира) и 1-2 мл воды, сильно встряхните и снова дайте расслоиться. Верхний бензиновый (петролейно-эфирный) раствор прилейте к основному бензиновому раствору. Операцию повторите до полного извлечения ксантофиллов, о чем можно судить по отсутствию окрашивания бензина (петролейного эфира). Иногда раствор ксантофиллов получается непрозрачным, для его просветления достаточно прибавления нескольких капель ацетона.

Все экстракты соберите воедино, объем измерьте.

### **Изучение извлекаемости хлорофилла растворителями разной степени полярности**

Существование хлорофилла в нескольких физико-химических формах, обусловленных их преимущественной связью с липидной или белковой фазой в липопротеидной структуре мембран хлоропластов, позволяет частично извлекать эти пигменты неполярными растворителями. При убывающей полярности растворителя обнаруживается специфическая зависимость количества хлорофилла, перешедшего в растворитель, от полярности растворителя, свидетельствующая о наличии в зеленой ткани листа, как минимум, двух форм хлорофилла.

Материалы и оборудование. Свежие листья вегетирующего растения (проростки ячменя или фасоли 10 – 12 суток), петролейный эфир, 100 %-й ацетон, кварцевый песок,  $CaCO_3$ , фарфоровые ступки, стеклянные пипетки на 1 мл, 5 мл, 10 мл, центрифужные градуированные пробирки, штатив для пробирок,

штатив для пипеток, дозатор, ножницы, марля, колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2, набор кювет для КФК-2, центрифуга, весы для уравнивания центрифужных пробирок.

Ход работы. Приготовьте по 10 мл растворителей:

1. чистый петролейный эфир;
2. 2,5 %-й раствор ацетона (этанола) в петролейном эфире;
3. 5 %-й раствор ацетона (этанола) в петролейном эфире;
4. 7,5 %-й раствор ацетона (этанола) в петролейном эфире;
5. 10 %-й раствор ацетона (этанола) в петролейном эфире;
6. 80 %-й раствор ацетона.

Навеску зеленых листьев измельчите ножницами и разотрите в течение 10 мин с песком и одним из приготовленных растворителей. Причем экстрагирование осуществите двумя способами:

а. Возьмите одну навеску растительного материала (0,1 г) и экстрагируйте пигменты последовательно каждым растворителем, сливая элюаты в отдельные пробирки для дальнейшего определения в них количества пигментов. Оставшиеся неизвлеченными под действием малополярного растворителя пигменты доизвлекайте 80 %-м ацетоном. Чтобы собрать экстракты в пробирки, растертую растительную массу отожмите через марлю. Затем содержимое пробирок доведите до одинакового объема (не менее 6 мл).

б. Во втором варианте работу выполняйте аналогично описанной в выше-следующем пункте, однако для каждого растворителя возьмите свою новую навеску растительного материала. Все навески должны быть одинаковыми по массе, так же как и объемы элюатов.

В обоих случаях дайте отстояться полученным элюатам и измерьте оптическую плотность на КФК-2 за красным светофильтром. Работать с прибором необходимо в следующей последовательности:

1. Включите колориметр в сеть за 15 мин до начала измерений. Во время прогрева кюветное отделение должно быть открыто (при этом шторка перед светоприемником перекрывает световой пучок).

2. Введите рабочий светофильтр.

3. Поместите в кюветное отделение две кюветы: одну, содержащую контрольный раствор, – напротив светового пучка, вторую – с опытным образцом – в другое отделение кюветодержателя сразу напротив первой.

4. Закройте крышку кюветного отделения.

5. С помощью ручек «Чувствительность», «Грубо», а затем «Точно» установите стрелку амперметра на деление 100 шкалы пропускания.

6. Поворотом рукоятки кюветной камеры поместите в световой поток кювету с исследуемым раствором.

7. Снимите показания по нижней шкале колориметра.

8. По окончании работы отключите колориметр от сети, очистите и протрите насухо кюветную камеру.

По полученным данным на одной сетке постройте графики зависимости оптической плотности элюатов (ось ординат), от содержания в применяемом растворителе ацетона (ось абсцисс).

По закону Бера оптическая плотность раствора имеет прямо пропорциональную зависимость от концентрации растворенных в нем веществ. Исходя из этого, об извлекаемости зеленых пигментов растворами разной степени полярности можно судить по графикам зависимости оптической плотности элюатов, измеренной при определенной длине волны, от содержания в применяемом растворителе ацетона.

## Работа 2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПИГМЕНТОВ

### ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПИГМЕНТОВ.

Пигменты фотосинтетического аппарата поглощают свет в пределах видимой части спектра (380 – 720 нм), благодаря чему эта область излучения называется фотосинтетически активной радиацией. Поглощение пигментами лучей определенной длины волны обусловлено их молекулярной структурой, наличием в них хромофорных группировок.

Большое количество в молекуле каротиноидов конъюгированных связей (чередующиеся одинарные и двойные) обуславливает поглощение ими синевioletовых лучей (400 – 550 нм). Поглощение же синевioletовых лучей зелеными пигментами обусловлено наличием в ядре хлорофилла замкнутой системы конъюгированных двойных связей.

В этой системе не принимает участия «полуизолированная» двойная связь в пиррольном кольце II между атомами углерода в положении 3 и 4. В пиррольном кольце IV благодаря наличию двух атомов водорода связь между атомами углерода в положении 7 и 8 одинарная в отличие от предшественника хлорофилла – протохлорофилла, у которого в этом месте двойная связь. Гидрированием связи между атомами С в положении 7 и 8, а также наличием ионов магния в порфириновом ядре обусловлено положение максимума поглощения молекулярно растворенного хлорофилла в красных лучах — 660 – 670 мкм (в зависимости от растворителя). В свою очередь, эти же элементы структуры хлорофилла обеспечивают низкую поглощающую способность

пигмента в зеленой области спектра.

В спектре поглощения хлорофилла в живых листьях максимум в красных лучах сдвинут в длинноволновую сторону и находится в пределах 678 – 681 нм. Это зависит от состояния пигментов в живых листьях, от связи их с белками, степени агрегации молекул хлорофилла и др. Хлорофилл, как и многие другие фотохимически активные вещества, способен флуоресцировать, т.е. излучать часть поглощенного света в виде лучей большей длины волны. Вытяжка хлорофилла в проходящем свете имеет изумруднозеленый цвет, а в отраженном — кроваво-красный.

**ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПИГМЕНТОВ.** При действии кислот атом магния в ядре хлорофилла замещается водородом и образуется феофитин оливково-зеленого цвета. При воздействии щелочей происходит омыление эфирных групп хлорофилла и образуется водорастворимая соль хлорофиллиновой кислоты.

Хлорофиллиновая кислота благодаря отсутствию фитола обладает гораздо большей гидрофильностью по сравнению с хлорофиллом и легко растворяется в разбавленных спиртовых растворах и воде. Эта реакция используется при отделении зеленых пигментов от желтых путем растворения их в разных несмешивающихся органических растворителях.

### **Химические свойства хлорофилла**

Образование феофитина под действием сильных кислот на хлорофилл сопровождается ослаблением поглощения в красной области спектра. Воздействуя на феофитин солями меди, цинка, ртути, можно восстановить зеленую окраску благодаря замещению двух протонов феофитина на один ион металла. Удаление же остатков фитола и метилового спирта путем щелочного гидролиза мало сказывается на спектре поглощения хлорофилла.

**Материалы и оборудование.** Спиртовая (ацетоновая) вытяжка пигментов, полученная согласно работе 1.1, петролейный эфир (гексан или бензин), 20 %-й раствор гидроксида калия (гидроксида натрия), 10 %-й раствор соляной кислоты, соль или насыщенный раствор уксуснокислой меди (уксуснокислого цинка), насыщенный раствор аскорбиновой кислоты, стеклянные пипетки на 5 мл, на 10 мл, химические пробирки, штатив для пробирок, штатив для пипеток, дозатор, держатель для пробирок, миллиметровая бумага, фильтровальная бумага, КФК-2, набор кювет для КФК-2, водяная баня.

**Ход работы.** а. Омыление хлорофилла щелочью. К 5 мл спиртовой (ацетоновой) вытяжки пигментов добавьте 3 капли 20 %-го раствора щелочи, взболтайте и оставьте на несколько минут. Прилейте в пробирку 8 мл петролейного эфира (гептана или бензина), интенсивно встряхивайте 30 сек и снова оставьте на несколько минут. Отметьте и объясните окраску спиртового и эфирного слоев.

б. Получение феофитина. Возьмите три пробирки со спиртовой (ацетоновой) вытяжкой пигментов (5 мл) и добавьте в две из них по несколько капель 10 %-й HCl. Получается буро-оливковое вещество — феофитин. Затем в одну из пробирок с феофитином внесите немного уксуснокислой меди (или несколько капель насыщенного раствора уксуснокислого цинка) и на водяной бане доведите до кипения. Если окраска не изменится, добавьте еще уксуснокислой меди (цинка) и продолжайте нагревать до изменения окраски. Зарисуйте изменения окраски и определите оптическую плотность на КФК-2 содержимого во всех трех пробирках и сделайте соответствующие выводы.

в. Восстановление ненасыщенных связей пигментов раствором аскорбиновой кислоты. В две пробирки прилейте по 2 мл вытяжки пигментов. Одну пробирку оставьте для сравнения, а во вторую добавляйте по каплям до обесцвечивания раствор аскорбиновой кислоты.

## **Исследование спектров поглощения хлорофилла и каротина с помощью колориметра фотоэлектрического концентрационного КФК-2**

Спектром поглощения называют зависимость величины поглощения от длины волны, выражаемую кривой поглощения света данным веществом. В видимой (400 – 700 нм) и ультрафиолетовой (200 – 400 нм) областях они отражают переходы делокализованных p-электронов двойных связей и электронов неподеленных пар азота и кислорода в молекуле. Благодаря тому, что длина волны поглощенного света соответствует определенному переходу, пики на спектрах поглощения вещества, а также характер и вид спектра обусловлены присутствием в нем известных структур (хромофоров): карбонильных и пептидных групп, остатков ароматических кислот, пуриновых или пиримидиновых азотистых оснований и других. То есть различные по химической природе вещества имеют характерные для них спектры поглощения, которые характеризуются числом и положением максимумов поглощения, интенсивностью отдельных полос поглощения, их полушириной.

Спектр поглощения является важной физической характеристикой фотохимически активных соединений, так как позволяет судить о количестве энергии, необходимой для активации данной фотореакции. Исследование спектров поглощения необходимо во многих случаях работы с пигментами, так как они содержат информацию об индивидуальных формах пигментов, присутствующих в биологической системе, их состоянии, взаимодействии и взаимопревращении в процессах биосинтеза и т.д.

Чтобы определить максимум спектра поглощения света пигментом, можно использовать регистрирующие спектрофотометры (СФ) или колориметры. Выбор прибора для данного типа исследований связан в первую очередь с тем, насколько близко расположены линии колебательных и вращательных

переходов на спектрах молекул.

Исследования спектров поглощения пигментов можно производить в живом листе или в вытяжке.

Материалы и оборудование. Экстракт хлорофилла в петролейном эфире, раствор каротина в петролейном эфире, полученный при омылении хлорофилла щелочью, петролейный эфир, фильтровальная бумага, пипетки на 5 мл, штатив для пробирок, КФК-2, набор кювет для КФК-2.

Ход работы. Заполните контрольную кювету чистым растворителем, рабочую кювету опытным раствором, содержащим пигмент (раствор при необходимости разведите до светло-зеленого оттенка). Перенесите кюветы в кюветодержатель, установите последний в кюветное отделение КФК-2. Определите оптическую плотность раствора по шкале D при разных длинах волн, начиная от 440 нм и заканчивая 750 нм.

По результатам исследования постройте графики зависимости поглощения раствора от длины волны, откладывая по оси абсцисс длину волны ( $\lambda$ ), а по оси ординат плотность (D), и сравните спектральные свойства хлорофилла и каротина.

### **Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла**

Фотосенсибилизированный хлорофиллом перенос электрон-протонной пары и передача ее акцепторам может быть показана в модельных опытах с извлеченным из растения пигментом. Для этого надо фиксировать электрон-протонную пару в легкодоступной для обнаружения форме.

В модельной системе, состоящей из донора электрона (аскорбиновой кислоты), акцептора электрона (метилового красного) и спиртового раствора хлорофилла, под действием света происходит фотосенсибилизированный хлорофиллом перенос электрона от аскорбиновой кислоты к метиловому красному (MR). При этом аскорбиновая кислота окисляется, а по изменению окраски раствора можно судить об активности реакции.

Материалы и оборудование. Спиртовая вытяжка пигментов, полученная согласно работе 1.1, кристаллическая аскорбиновая кислота, 0,04 %-й спиртовой раствор метилового красного, этиловый спирт, химические пробирки, стеклянные пипетки на 5 мл и 10 мл, штатив для пробирок, штатив для пипеток, шпатель, настольная лампа, весы торсионные.

Ход работы. В пробирку налейте 5 мл спиртовой вытяжки хлорофилла. К этому раствору добавьте кристаллическую аскорбиновую кислоту (50 мг) и растворяйте ее при встряхивании до насыщения раствора. Затем добавьте 1 мл спиртового раствора метилового красного. Реакционную смесь хорошо перемешайте путем интенсивного встряхивания и выставьте на свет. Одновременно с опытной приготовьте 3 контрольные пробирки. Контролем служит аналогичный опыт в темноте, опыт без хлорофилла с заменой его равным

объемом спирта и опыт без аскорбиновой кислоты. В последних двух случаях пробирки, как и опытная, освещаются светом.

## 4.2 Спектрофотометрические методы исследования пигментов

Хлорофилл и каротиноиды – важнейшие компоненты фотосинтетического аппарата листьев. Количество хлорофиллов «а» и «b», их суммарное содержание хл(«а»+«b»), соотношение хлорофилла «а» к хлорофиллу «b», содержание каротина, ксантофиллов, суммы всех каротиноидов, соотношение зеленых пигментов к желтым в листьях зависит от жизнедеятельности организма, его генетической природы. Поэтому оно может быть использовано как физиологический показатель, характеризующий онтогенетические, возрастные и генетические особенности растений. Количество пигментов отражает и реакцию растительного организма на условия произрастания. Поэтому при физиологических исследованиях часто возникает необходимость проследить за динамикой содержания хлорофилла и каротиноидов в отдельных органах. Такого рода наблюдения можно производить с использованием фотометрических методов исследования.

Данная группа методов основана на наличии взаимодействия излучения с однородными системами. В фотометрических методах используют избирательное поглощение света молекулами анализируемого вещества. Природа полос поглощения в ультрафиолетовой (10 – 400 нм) и видимой (400 – 760 нм) областях спектра связана в основном с числом и расположением электронов в поглощающих молекулах и ионах, в то время как в инфракрасной области (0,8 – 1000 мкм) она связана с колебаниями атомов в молекулах поглощающего вещества.

Методы фотометрического анализа подразделяются на прямые и косвенные. Первые позволяют проводить исследования только после перевода определяемого иона в состав светопоглощающего комплекса с помощью соответствующего реагента. Вторые требуют наличия вспомогательных соединений, которые при взаимодействии с определенными веществами либо разрушаются, либо образуют новые светопоглощающие соединения.

В зависимости от того, какая аппаратура используется в ходе исследования, все фотометрические методы подразделяются на спектрофотометрические и фотоколориметрические. Анализ с использованием этих методов производится по поглощению монохроматического и полихроматического света видимой области спектра, соответственно. Оба метода основаны на пропорциональной зависимости между поглощением и концентрацией поглощающего

вещества.

Если луч света проходит через слой окрашенной жидкости, то при выходе из нее интенсивность его будет ослаблена, т.к. часть света поглощается, отражается и рассеивается жидкостью. При этом отношение интенсивности света, прошедшего через раствор толщиной 1 см, к интенсивности падающего света называется коэффициентом пропускания, есть величина постоянная, не зависящая от абсолютной интенсивности падающего света.

В то же время световые лучи поглощаются тем больше, чем больше толщина слоя раствора и концентрация окрашенного вещества (закон Ламберта-Бера). На основании этого по изменению интенсивности света, прошедшего через раствор, можно определить концентрацию вещества в нем.

В основе любого метода измерения интенсивности окраски лежит определение ослабления интенсивности светового потока после прохождения его через испытуемый раствор. Его определяют путем сравнения двух световых потоков: одного, проходящего через испытуемый раствор, другого — через растворитель или через стандартный раствор. Сравнение производят визуально или с помощью фотоэлектрических приборов.

### Работа 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ХЛОРОФИЛЛА И КАРОТИНОИДОВ, НАХОДЯЩИХСЯ В СМЕСИ

Введение. Для фотометрических измерений используют две группы приборов: фотоколориметры и спектрофотометры. В колориметрах нужные спектральные диапазоны выделяют при помощи светофильтров, ограничивающих участки спектра, в которых могут проводиться измерения. В спектрофотометрах участки спектра выделяются при помощи призм или дифракционных решеток, что позволяет устанавливать любую длину волны в заданном диапазоне. Кроме того, в этом приборе есть два источника сплошного спектра: дейтериевая лампа – для работы в интервале от 186 до 350 нм (положение «Д») и лампа накаливания для работы в интервале от 340 до 1100 нм (положение «Н»).

Конкретная последовательность операций при измерении оптической плотности или пропускания зависит от конструкции спектрофотометра или колориметра. Однако основные принципы остаются неизменными. Сначала устанавливают необходимую длину волны, выбирая светофильтр на колориметре или вращая соответствующую рукоятку на спектрофотометре. Затем устанавливают ноль. Для этого в световой поток помещают кювету со стандартным раствором. Изменяя ширину щели, добиваются того, чтобы показания прибора соответствовали величине, предусмотренной инструкцией. На следующем этапе стандартный раствор заменяют исследуемым и производят отсчет величины оптической плотности или пропускания.

Одним из наиболее точных количественных определений каждой группы пигментов (каротин, хлорофилл «а», хлорофилл «в» и т.д.) является установление их наличия и количества в смеси без предварительного разделения на спектрофотометре. Спектрофотометрическое определение позволяет без калибровочных кривых, на основании экспериментально полученных данных по оптической плотности и известных для каждого пигмента величин молярного или удельного коэффициента погашения при определенной длине волны рассчитать концентрацию пигментов.

Для массовых количественных определений широко используются фотоэлектроколориметры. В этом случае предварительно для каждого пигмента составляют калибровочную кривую, беря в качестве исходного раствор пигмента известной концентрации или искусственно приготовленные стандарты.

Определив тем или иным методом концентрацию пигментов в литре или миллилитре, вносят поправку на разбавление раствора. Зная объем исследуемых растворов и взятые для экстракции навески листьев, рассчитывают содержание в них пигментов в процентах на сырой или сухой вес или в миллиграммах на единицу листовой поверхности.

### **Определение концентрации хлорофилла и каротиноидов на спектрофотометре**

Спектрофотометрический анализ – наиболее точный количественный метод определения содержания пигментов листа. Концентрация пигментов на спектрофотометре определяется по оптической плотности. Этот прибор позволяет выполнять анализ смесей веществ с близкими максимумами поглощения, что достигается за счет использования монохроматора, вследствие чего удается установить содержание хлорофиллов и каротиноидов в вытяжке без предварительного разделения. Оптическую плотность экстракта на спектрофотометре измеряют при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов «а» и «b» в красной области спектра и при длине волны абсорбционного максимума каротиноидов. При этом учитывают, что положение максимума поглощения несколько меняется в зависимости от используемого растворителя. Концентрацию пигментов рассчитывают по соответствующим уравнениям:

для 100 %-го раствора ацетона (по Реббелену):

$$C_{\text{хл. а}} = 9,784 \cdot D_{662} - 0,990 \cdot D_{644},$$

$$C_{\text{хл. b}} = 21,426 \cdot D_{644} - 4,650 \cdot D_{662},$$

$$C_{\text{хл. а + хл. b}} = 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644},$$

$$C_{\text{кар}} = 4,695 \cdot D_{440,5} - 0,268 \cdot C_{\text{хл. а + хл. b}};$$

для 85 %-го раствора ацетона (по Реббелену):

$$C_{\text{хл. а}} = 10,3 \cdot D_{663} - 0,918 \cdot D_{644},$$

$$C_{\text{хл. b}} = 19,7 \cdot D_{644} - 3,87 \cdot D_{663},$$

$$C_{\text{хл. а} + \text{хл. б}} = 6,4 \cdot D_{663} + 18,8 \cdot D_{644},$$

$$C_{\text{кар}} = 4,75 \cdot D_{452,5} - 0,226 \cdot C_{\text{хл. а} + \text{хл. б}};$$

для 80 %-го раствора ацетона (по Вернону):

$$C_{\text{хл. а}} = 11,63 \cdot D_{665} - 2,39 \cdot D_{649},$$

$$C_{\text{хл. б}} = 20,11 \cdot D_{649} - 5,18 \cdot D_{665},$$

$$C_{\text{хл. а} + \text{хл. б}} = 6,45 \cdot D_{665} + 17,72 \cdot D_{649};$$

для 96 %-го раствора этанола:

$$C_{\text{хл. а}} = 13,70 \cdot D_{665} - 5,76 \cdot D_{649},$$

$$C_{\text{хл. б}} = 25,80 \cdot D_{649} - 7,60 \cdot D_{665},$$

$$C_{\text{хл. а} + \text{хл. б}} = 6,10 \cdot D_{665} + 20,04 \cdot D_{649},$$

где  $C_{\text{хл. а}}$ ,  $C_{\text{хл. б}}$ ,  $C_{\text{хл. а} + \text{хл. б}}$  и  $C_{\text{кар}}$  — соответственно концентрации хлорофиллов «а» и «б», их суммы и каротиноидов, мг/л;  $D$  — экспериментально полученные величины оптической плотности при соответствующих длинах волн.

Кроме того, при работе на спектрофотометре нужно предварительно установить положение максимумов поглощения для пигментов, так как обычно наблюдаются небольшие отклонения (с одним и тем же растворителем). К примеру, концентрацию хлорофилла и его количество в образце после разделения пигментов определяют также на основании измерения оптической плотности раствора лишь в красной области спектра. Таким образом, задача сводится к отыскиванию «красного» максимума поглощения, для чего измерения оптической плотности для хлорофилла «а» обычно начинают при  $\lambda = 658$  нм и продолжают через каждые 2 нм до тех пор, пока в ряду измерений не отыщется максимальное значение оптической плотности. Максимальную оптическую плотность подставляют в формулу расчета концентрации хлорофилла, а выбор длины волны для определения максимальной оптической плотности для хлорофилла «б» корректируется по хлорофиллу «а». Она будет на столько же единиц длины волны (в нм) меньше или больше, на сколько она меньше или больше, соответственно, для хлорофилла «а».

В норме максимальное значение оптической плотности для хлорофилла «а» приходится на 660 – 662 нм, для хлорофилла «б» — 638 – 646 нм. Большие отклонения от этих величин свидетельствуют о неисправности прибора. Если работают с неразделенными пигментами, то максимум поглощения проверяют только в пределах 660 – 663 нм.

Чтобы избежать погрешностей за счет вклада в значение оптической плотности пигментов поглощения различных примесей и загрязнения стенок кюветы, эту величину измеряют также и для  $\lambda = 720$  нм, которое вычитают из значений оптической плотности хлорофилла.

Концентрацию хлорофилла «а» и хлорофилла «б» определяют по формулам:

$$C_a = 29,24 \cdot D_a - D_{720},$$

$$C_b = 42,26 \cdot D_b - D_{720},$$

где  $C_a$  и  $C_b$  — концентрации хлорофилла «а» и хлорофилла «b», мкг/мл, соответственно, а  $D_a$ ,  $D_b$ ,  $D_{720}$  — экспериментально полученные величины оптической плотности.

Материалы и оборудование. Листья комнатных растений, 100 %-й ацетон, кварцевый песок, з, фильтровальная бумага, ножницы, фарфоровые ступки с пестиками, колбы Бунзена, стеклянные градуированные центрифужные пробирки, воронки со стеклянным фильтром 2, стеклянные палочки, штатив для пробирок, весы торсионные, спектрофотометр, набор кювет для спектрофотометра, насос.

Ход работы. Получите вытяжку пигментов из зеленых листьев растений одного яруса как описано в работе 1.1. Для этого используйте навеску 0,03 г и 80 %-й ацетон (85 %-й, 100 %-й ацетон или 96 %-й спирт). Храните вытяжку в темном холодном месте.

Спектрофотометрический анализ пигментов следует выполнять при комнатной температуре на рассеянном свете, так как при сильном освещении может произойти фотоокисление хлорофилла.

Концентрацию пигментов рассчитайте по соответствующим уравнениям (см. выше). Определив концентрацию пигмента, найдите его содержание в опытном материале по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot B}{A},$$

где  $B$  — количество хлорофилла в вытяжке, мг;  $A$  — масса сырых листьев, взятых для анализа, мг; 100 — коэффициент для выражения в процентах.

Содержание хлорофилла в листьях растений составляет в среднем около 0,3 % сырой массы (0,1 – 0,7 %), при расчете на 1 дм<sup>2</sup> листовой поверхности. Количество хлорофилла варьирует в пределах 0,7-0,8 мг; каротиноидов в листьях примерно в 3 – 8 раз меньше, чем хлорофилла.

### **Определение концентрации суммы хлорофиллов на концентрационном фотоэлектрическом колориметре КФК-2**

При работе с фотоколориметрами не сравнивают непосредственно испытуемые растворы со стандартными, а определяют отношение интенсивности проходящего света к интенсивности падающего при известной толщине слоя раствора.

При фотометрических определениях не нужно знать абсолютные величины интенсивности света, достаточно определить его относительные величины. При этом можно пользоваться разными показателями. Так, коэффициент пропускания показывает, какая часть световой энергии проходит через

раствор. Он меняется в пределах от 100 % до 0 % (за 100 % принимается интенсивность света, прошедшего через растворитель). Оптическая плотность раствора — величина обратная коэффициенту пропускания — указывает, во сколько раз интенсивность света стала слабее после прохождения его через раствор.

В этом методе пользуются калибровочными кривыми, выражающими зависимость оптической плотности и пропускания света от концентрации раствора. При определении концентрации вещества в растворе с помощью калибровочного графика следует сначала выбрать светофильтр, затем выбрать кювету, построить калибровочную кривую и, наконец, измерить оптическую плотность исследуемого раствора и по калибровочной кривой определить его концентрацию.

Выбор светофильтра обычно производят в тех случаях, когда не известны длины волн, в которых оптическая плотность исследуемого образца максимальна. Для этого строят график зависимости оптической плотности образца от длины волны, используя весь диапазон длин волн прибора; находят максимальную величину оптической плотности, при которой ход кривой примерно параллелен горизонтальной оси (оптическая плотность мало зависит от длины волны).

Выбор кюветы проводится визуально: если раствор интенсивно окрашен (темный), то пользуются кюветами с малой длиной оптического пути (1 – 5 мм), если слабо окрашен — с большой длиной оптического пути (20 – 50 мм). Лучше работать с кюветами постоянной длины, если же приходится работать с кюветами разной длины, то полученные величины нужно пересчитать на толщину слоя 10 мм. В этом случае следует проверить на стандартном растворе оптическую плотность его при пользовании кюветами разной длины для установления коэффициента пересчета.

Для построения калибровочных графиков готовят серию (5 – 8) стандартных растворов исследуемого вещества убывающих или возрастающих концентраций из одного исходного («маточного») раствора известной концентрации. Раствор каждой концентрации готовят в трехкратной повторности. Компенсирующей жидкостью (контролем) в этих определениях служит растворитель.

При выборе интервала концентраций следует помнить следующее: оптическая плотность исследуемого раствора должна соответствовать примерно середине калибровочного графика, полученный график должен отражать линейную зависимость оптической плотности от концентрации раствора, построение калибровочного графика и определение оптической плотности исследуемого раствора должно производиться при одной и той же длине волны.

Полученные результаты изображаются графически. На оси абсцисс откла-

дывают значения концентрации растворов, на оси ординат — соответствующие им значения оптической плотности. Вычерчивают кривые, которыми в дальнейшем пользуются для определения концентрации исследуемого вещества в растворе. В случаях, подчиняющихся закону Ламберта-Бера, когда величина оптической плотности раствора пропорциональна его концентрации, кривая будет иметь вид прямой линии, идущей от нуля координат. Тогда можно ограничиться её определением у трех-четырех растворов. В случаях, не подчиняющихся закону Ламберта-Бера, нужно строить эмпирические кривые на основании определения оптических плотностей большого количества стандартных растворов различной концентрации.

Определив на приборе оптическую плотность исследуемого раствора, находят по калибровочной кривой значение концентрации, которой она соответствует. Для этого из отмеченной на оси ординат экспериментально полученной точки оптической плотности проводят прямую линию, параллельную оси абсцисс, до её пересечения с калибровочной кривой. Из этой точки пересечения опускают перпендикуляр на абсциссу. Точка пересечения перпендикуляра с абсциссой соответствует концентрации испытуемого раствора.

Полученные калибровочные кривые пригодны для работы только на приборе с тем светофильтром и той толщиной слоя жидкости, при которых они составлены. Точность фотометрических определений зависит от степени поглощения света. Поэтому нужно так подобрать толщину слоя жидкости (длину кювет), чтобы пропускание света было 15 – 80 %. При фотоэлектроколориметрии рекомендуется работать с оптической плотностью в пределах от 0,1 до 0,8.

Чувствительность колориметрических методов (при работе на КФК) определяют следующим образом: находят раствор, который при помещении его в кювету длиной 1 см дает оптическую плотность 0,05, то есть ту минимальную её величину, при которой результаты можно считать еще достоверными. Зная концентрацию этого раствора (например, 0,1 мкг/мл) и объем кюветы (4 мл), рассчитывают количество вещества в кювете. Оно равно 0,4 мкг и характеризует чувствительность данного метода.

**ВНИМАНИЕ!** Для составления калибровочных кривых надо иметь исходный раствор тех же пигментов известной концентрации, предварительно установленной на каком-либо приборе. При исследовании хлорофиллов исходный раствор должен иметь их концентрацию 40 – 60 мг/л.

Из полученного исходного раствора путем соответствующих разбавлений готовят серию (4-5) стандартных растворов с концентрацией хлорофилла в пределах от 1 до 15 мг/л. Растворы готовят в предварительно прокальброванных мерных колбочках на 25 мл (двух-, трехкратная повторность).

При отсутствии раствора естественного пигмента пользуются искусствен-

но приготовленными стандартами. Для определения зеленых пигментов в качестве стандарта пользуются раствором Гетри (в мерную колбу объемом 100 мл наливают 28,5 мл 1 %-го раствора  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 50 мл 2 %-го раствора  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  и 10 мл 2н раствора  $\text{NH}_4\text{OH}$ , доливают дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают), окраска которого соответствует окраске раствора, содержащего 85 мг/л омыленного хлорофилла.

Раствор Гетри ранее использовался для колориметрического определения пигментов, т.е. для визуальной оценки окраски раствора во всём диапазоне видимого спектра. Применение данного раствора для фотоэлектроколориметрирования (где используются узкие участки видимого спектра) имеет определённую погрешность, растущую с уменьшением области применяемого участка спектра. В силу данного ограничения раствор Гетри не применяется в качестве стандарта в спектрофотометрических исследованиях. Разбавление полученного по прописи раствора для построения калибровочной кривой также неприемлемо.

Материалы и оборудование. Листья растения, 100 %-й ацетон, раствор Гетри, кварцевый песок,  $\text{CaCO}_3$ , фильтровальная бумага, ножницы, ступки с пестиками, стеклянные градуированные центрифужные пробирки, колбы Бунзена, химические пробирки, стеклянные пипетки на 5 мл и 10 мл, штатив для пробирок, штатив для пипеток, шпатель, воронки со стеклянным фильтром 2, стеклянные палочки, КФК-2, набор кювет для КФК-2, весы торсионные, насос.

Ход работы. Приготовьте вытяжку пигментов из свежего растительного материала тем же способом, что и в предыдущей работе. Для этого возьмите навеску листьев любого комнатного растения массой 0,05 г, а в качестве растворителя используйте 100 %-й ацетон.

Определите концентрацию суммы хлорофиллов в полученной вытяжке, пользуясь спектрофотометром СФ-26. Затем путем двукратного разведения «маточного» раствора с известной концентрацией хлорофилла приготовьте серию стандартных растворов убывающей концентрации. Найдите оптическую плотность каждого из них на КФК-2 за синим светофильтром. На основании полученных данных постройте калибровочный график.

По калибровочному графику определите концентрацию хлорофилла в вытяжке, полученной в первой работе. Выразите её в процентах массы сырых листьев по той же формуле, что и в предыдущей работе.

## 4.3 Хроматографические методы исследования пигментов

При исследовании биологических соединений постоянно возникает необходимость их выделения и очистки. Один из наиболее удобных и тонких методов разделения смеси — хроматографический. С его помощью можно разделять различные количества материала (от пикограммов до граммов).

Термин «хроматография» был предложен первооткрывателем метода, русским химиком М.С.Цветом в 1906 г. Он образовал его из двух греческих слов «цвет» и «писать». Сам М.С.Цвет применил его впервые для разделения хлорофиллов и других растительных пигментов в трубке, наполненной сухим твердым адсорбентом, таким как сахароза. Экстракт пигментов вводился в трубку (впоследствии названной колонкой), которую затем промывали (или элюировали) органическим растворителем. Компоненты экстракта двигались по колонке с различной скоростью, образуя отдельные окрашенные полосы. После полного разделения полос влажный столбик адсорбента осторожно извлекался из колонки и разрезался на части, каждая из которых содержала определенный пигмент.

Уже тогда М.С.Цвет вполне обоснованно предположил, что его метод применим и к бесцветным веществам, однако в то время не было приборов, позволяющих контролировать процесс разделения бесцветных веществ. Сейчас такие приборы (их называют детекторами) имеются в большом разнообразии.

Хроматографическое разделение основано на различии в скоростях перемещения компонентов образца, которое в свою очередь определяется их распределением между двумя фазами: неподвижной (может быть твердой, жидкой или смесью твердой и жидкой) и подвижной (жидкой или газообразной). Обычно подвижная фаза перемещается по неподвижной или пропускается через нее. При этом для хроматографического разделения смеси веществ необходимо выполнение одного из условий:

1. адсорбционное равновесие между неподвижной твердой и подвижной жидкой фазами (адсорбционная хроматография);
2. равновесное распределение между неподвижной жидкой и подвижной жидкой фазами (хроматография на бумаге);
3. равномерное распределение между неподвижной жидкой и подвижной газовой фазами (газо-жидкостная хроматография);
4. ионообменное равновесие между ионообменной смолой (неподвижная фаза) и электролитом (ионообменная хроматография);

5. равновесное связывание макромолекулы с малой молекулой, по отношению к которой она проявляет сродство (аффинная хроматография).

Практически образец смеси веществ вводят, например, шприцем в слой неподвижной фазы, а затем различные соединения, входящие в состав смеси, вместе с подвижной фазой (элюент) двигаются по слою, несомые этой фазой. Скорость перемещения зависит от величины взаимодействия (сродства) компонентов в неподвижной и подвижной фазах, и в результате достигается разделение компонентов. Взаимодействие разделяемых веществ с неподвижной фазой в той или иной степени препятствует их свободному перемещению с потоком жидкости или газа и снижает их скорость движения. Иногда трудно определить механизм взаимодействия вещества с неподвижной фазой, поэтому для обозначения таких процессов используют термин сорбция, а неподвижную фазу называют сорбентом. В процессе хроматографического разделения молекулы веществ многократно проходят этапы сорбции и десорбции: скорость их перемещения относительно неподвижной фазы постоянно меняется от нуля до скорости потока газа или жидкости. Этот динамический процесс и лежит в основе хроматографического разделения.

Распределение соединения между двумя несмешивающимися фазами определяется коэффициентом распределения (отношением концентрации вещества (C) в каждой из двух фаз):

$$K_p = \frac{C_{\text{компонентав подвижной фазе}}}{C_{\text{компонентав неподвижной фазе}}}.$$

Этот коэффициент и  $R_f$  вещества связаны соотношением:

$$K_p = \frac{S_{\text{п}}}{S_{\text{н}}} \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right),$$

где  $S_{\text{п}}$  и  $S_{\text{н}}$  — площади поперечных сечений подвижной и неподвижной фазы. Таким образом, коэффициент распределения при постоянном отношении  $S_{\text{п}}/S_{\text{н}}$  есть величина пропорционально зависящая от  $R_f$  и может быть определена через него.

Показатель  $R_f$  является аналогией времени удерживания и зависит как от свойств разделяемых веществ, состава подвижной фазы и сорбента, так и от физических параметров. Определение значения  $R_f$  проводят как отношение расстояния, прошедшего веществом (L) к расстоянию, прошедшего фронтом растворителя ( $L_0$ ):

$$R_f = \frac{L}{L_0}.$$

$R_f$  — величина безразмерная и имеет значение от 0 до 1. Однако в литературе нередко встречаются такие показатели как  $hR_f$ ,  $R_f \cdot 100$ , которые являются теми же  $R_f$ , но умноженными на 100, для того, чтобы не оперировать десятичными значениями.

На значение  $R_f$  не влияет расстояние, пройденное фронтом растворителя, однако во многих методиках описывается прохождение фронта на расстояние 10 см. Это используется только для облегчения расчетов  $R_f$ .

Взаимодействие между разделяемым веществом и фазами хроматографической системы может осуществляться или на поверхности фазы, или в объеме. В первом случае хроматография называется адсорбционной, во втором — распределительной.

По расположению фаз хроматографические системы подразделяют на две группы: плоскостные и колоночные. Последние, в свою очередь, разделяются на:

- насадочные, заполненные зернистым твердым материалом (мелкими шариками), либо являющимся разделительной средой, либо служащим носителем неподвижной жидкой фазы;
- капиллярные, внутренние стенки которых покрыты пленкой неподвижной жидкости или слоем твердого адсорбента (поглотителя).

После разделения необходимо идентифицировать все компоненты и оценить их количественно. Такова общая схема хроматографии.

#### Работа 4. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ ПИГМЕНТОВ

##### **Разделение пигментов листа методом колоночной хроматографии (по М.С.Цвету)**

Метод хроматографической адсорбции дает возможность разделить сложную смесь пигментов на отдельные компоненты. Принцип метода заключается в том, что разделяемые вещества избирательно адсорбируются из какого-либо растворителя на твердом порошкообразном адсорбенте: вещества с большим эффективным коэффициентом распределения (отношением общего количества вещества в одной фазе к таковому в другой) продвигаются по колонке с большей скоростью, чем вещества с более низким коэффициентом.

Исследуемый раствор, содержащий несколько веществ, наносят на адсорбент колонки, а затем через колонку пропускают растворитель или смесь растворителей. Отдельные компоненты смеси благодаря различной адсорбируемости образуют зоны, которые располагаются последовательно в направлении убывающего адсорбционного сродства исследуемых веществ к адсорбенту. При промывании колонки чистым растворителем вещества будут вымываться из верхних слоев и вновь адсорбироваться в нижних слоях. При этом

действует закон адсорбционного замещения М.С.Цвета: компоненты смеси, обладающие большим адсорбционным сродством к сорбенту, вытесняют другие компоненты смеси.

Выбор растворителя и адсорбента в адсорбционной хроматографии не случаен, а взаимосвязан. Для получения хроматограмм пигментов М.С.Цвет применял полярные адсорбенты и аполярные растворители с низкой диэлектрической постоянной и малой диссоциирующей силой (петролейный эфир, бензол, сероуглерод). Растворители с большой диэлектрической постоянной (ацетон, этанол) способствуют элюции пигментов. Поэтому необходимо, чтобы в применяемых органических аполярных растворителях не было примесей, снижающих активность адсорбентов. Растворители для адсорбционного анализа должны быть перегнаны и сохраняться в сухом безводном состоянии.

Эффективность разделения чрезвычайно сильно зависит от правильного заполнения колонки адсорбентом. Обычно применяемые адсорбенты — кремниевая кислота, окись алюминия, карбонат кальция, карбонат цинка и окись магния. При выборе адсорбентов необходимо помнить, что некоторые из них в процессе разделения оказывают разрушающее действие на определенные соединения. Другие адсорбенты при хранении поглощают из атмосферы воду, что отрицательно сказывается на их адсорбционных

свойствах. В таких случаях для удаления воды и активации адсорбента, последний прогревают в течение некоторого времени при температуре 110 °С. Однако часто присутствие в адсорбенте воды наоборот повышает эффективность разделения.

Если нужно получить отдельные пигменты в чистом виде, прибегают к одному из следующих способов. Колонку высушивают, каждую окрашенную зону адсорбционного столбика выталкивают отдельно стеклянной палочкой или, если колонка пластиковая, вырезают, а затем помещают в колбочку или пробирку и растворяют в соответствующем растворителе, способном элюировать пигменты. Второй способ позволяет извлечь из колонки нужные пигменты благодаря пропусканию через нее растворителя до тех пор, пока не соберут все фракции по мере их выхода. Данный метод более удобен, так как не допускает соприкосновения адсорбированного материала с воздухом, что снижает вероятность его разложения.

В практике исследования пигментов колоночную хроматографию часто используют для разделения на отдельные компоненты смеси желтых пигментов, полученных, например, после отделения их от зеленых. Для этого набивают колонку длиной 4-5 см порошком  $MgCO_3$  и пропускают через нее раствор каротиноидов. Ксантофилл адсорбируется  $MgCO_3$  и располагается соответствующим слоем в верхней части колонки, каротин же проходит не задерживаясь. После просасывания всего раствора промывают трубку чистым

петролейным эфиром. Отделив каротин, приступают к вымыванию ксантофилла. Для этого помещают трубку в другую колбу, приливают 1 мл этилового спирта, слегка взмучивают верхний слой  $MgCO_3$  стеклянной палочкой и отсасывают. Затем вымывают ксантофилл петролейным эфиром, в котором находится 1-2 % этилового спирта.

Материалы и оборудование. Листья комнатных растений, этиловый спирт, петролейный эфир или бензин, бензол, сахароза,  $CaCO_3$ , кварцевый песок, стеклянные трубки длиной 15 см, диаметром 1 см, колбы Бунзена, воронки со стеклянным фильтром, стеклянные палочки, фарфоровые ступки с пестиками, стеклянные пипетки на 1 мл, стеклянные градуированные центрифужные пробирки, пробки к пробиркам, фильтровальная бумага, вата, узкий шпатель, дозатор, штатив для пипеток, штатив для пробирок, насос.

Ход работы. Получите вытяжку пигментов из зеленых листьев растений одного яруса как описано в работе 1. Для этого используйте навеску 1,0 г и 96 %-й спирт (100 %-й или 80 %-й ацетон). Храните вытяжку в темном холодном месте.

Возьмите стеклянную трубку длиной 15 см, диаметром 1 см, нижний конец которой заужен. Перед набивкой колонки в него поместите ватную пробку, чтобы адсорбент не высыпался. Трубку постепенно заполните тонко размолотой сахарозой. Уплотните адсорбент стеклянной палочкой или, постукивая колонкой о твердую поверхность. Заполняйте колонку до тех пор, пока уровень адсорбента в трубке не будет на 2-3 см ниже верхнего её края.

Готовую к анализу колонку закрепите в малом отверстии резиновой пробки, при помощи которой закрыта колба для отсасывания. Затем в трубку налейте бензин (петролейный эфир) и слегка отсасывайте насосом. Когда адсорбент будет смочен растворителем, перенесите в колонку обезвоженный экстракт пигментов и дайте раствору проникнуть в верхние слои адсорбента, а потом включите насос. После того, как в нижней части трубки неокрашенным остается лишь небольшой слой адсорбента, отсасывание прекратите. Таким образом, вами получена первичная хроматограмма.

Если полного разделения смеси не произошло ввиду того, что зоны отдельных пигментов заходят одна в другую, колонку промойте смесью бензина (петролейного эфира) и бензола в соотношении 10:1. Под влиянием передвигающихся растворителей, конкурирующих с адсорбентом за связывание вещества, произойдет четкое обособление окрашенных зон.

В конечном итоге пигменты расположатся следующим образом. Самая верхняя желто-зеленая зона — хлорофилл «b», ниже сине-зеленая зона — хлорофилл «a» и, наконец, в самом низу ярко-желтая зона — ксантофилл. Каротин вместе с растворителями полностью отсасывается в колбу.

Зарисуйте полученную хроматограмму, в выводах объясните наблюдаемое

разделение пигментов.

### **Определение содержания пигментов в листьях методом одномерной бумажной хроматографии**

Одним из широко применяемых методов для быстрого разделения малых количеств пигментов, находящихся в смеси, на отдельные компоненты является метод бумажной хроматографии. Он основан на распределении пигментов между двумя жидкими фазами. Дело в том, что вода, поглощаемая хроматографической бумагой из атмосферы, задерживается между волокнами целлюлозы и представляет собой неподвижную фазу. Вследствие этого хроматографическую бумагу рассматривают как комплекс целлюлозограда, который напоминает концентрированный водный раствор полисахаридов. Такие растворы никогда не смешиваются с большинством органических растворителей, в том числе и с теми, которые смешиваются с водой. Поэтому даже при использовании для бумажной хроматографии в качестве растворителей ацетона, бутанола и других, смешивающихся с водой растворителей, будет происходить разделение.

Когда по бумаге под действием капиллярных сил движутся растворители, молекулы пигментов, нанесенные на бумагу, распределяются между двумя фазами в соответствии с коэффициентом распределения. Чем выше растворимость пигмента в подвижной фазе, тем дальше он продвигается по бумаге вместе с растворителем вследствие того, что к пятну непрерывно поступают новые порции растворителя, молекулы, захваченные неподвижной фазой, переходят в подвижную фазу. При этом соблюдается постоянство коэффициента распределения, который не зависит от концентраций веществ в этих двух фазах, и для сохранения её постоянного значения компонент, находящийся в неподвижной фазе, непрерывно переходит в поступающий по капиллярам растворитель и уносится им вдоль полосы бумаги.

Расстояние, пройденное нанесенным на бумагу пигментом в направлении движения растворителя, характеризуется величиной  $R_f$ , которая представляет собой отношение расстояния, пройденного растворенным пигментом, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя. В стандартных условиях эта величина для данного пигмента постоянна и соответствует его коэффициенту распределения.

Жидкие фазы для хроматографии должны удовлетворять следующим основным требованиям:

- жидкости не должны смешиваться друг с другом;
- неподвижной фазой должен быть растворитель, в котором компоненты разделяемой смеси имеют меньшую растворимость;

- растворимости (а значит и коэффициенты распределения) компонентов разделяемой смеси должны быть различными для выбранной пары растворителей;
- состав растворителя в процессе хроматографирования не должен изменяться (т.е. процесс нужно проводить в герметичной фазе);
- используемые растворители необходимо насыщать водой, бумага также должна быть достаточно влажной, поскольку в бумажной хроматографии почти всегда имеют дело с распределительным принципом.

Для разделения пигментов предложено много вариантов бумажной хроматографии: восходящие и нисходящие, одномерных, двухмерных и круговых хроматограмм с применением разных растворителей. При восходящей хроматографии бумажную полосу погружают в растворитель вертикально, сворачивая в виде трубки или подвешивая таким образом, чтобы нижний конец хроматографической бумаги был погружен в растворитель, но при этом полоса для разделения находилась выше уровня растворителя. По мере движения растворителя под действием капиллярных сил вертикально вверх происходит разделение растворенных веществ. При нисходящей хроматографии верхний конец бумажной полосы со смесью пигментов, нанесенных недалеко от кромки бумаги, закрепляют в лотке, который размещают в верхней части камеры. Нижний конец бумаги располагают так, чтобы он не касался налитого на дно камеры растворителя. В результате действия капиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает передвигаться вниз по бумажной полосе, в результате чего смесь разделяется. Восходящую хроматографию как более простую применяют чаще.

Выбор метода разделения пигментов зависит от задачи исследования. Например, для двухмерных хроматограмм исходная смесь наносится в виде небольшого пятна, поэтому можно разделить только малые количества пигментов, и разгоняется в двух направлениях. Если нужны большие количества пигментов для количественных определений или других целей, то лучше проводить разделение пигментов на одномерной хроматограмме (разделение пигментов лишь по ходу волокон бумаги) и наносить экстракт не в виде пятна, а в виде полоски на одном конце бумаги. Еще одним немаловажным преимуществом одномерной хроматограммы является большая скорость разделения и получение достаточного количества отдельных пигментов.

Некоторые варианты хроматограмм позволяют лучше разделить каротиноиды, отделить их от зеленых пигментов, но хуже отделяют хлорофилл «а» от хлорофилла «b». При других вариантах, наоборот, лучше разделяются

зеленые пигменты. Это относится главным образом к одномерным хроматограммам при разделении пигментов с применением одного растворителя. Более полное разделение пигментов достигается в двухмерных хроматограммах при применении нескольких растворителей.

Хроматографирование выполняют в герметично закрытых сосудах, где поддерживают насыщенную парами растворителей атмосферу, что предотвращает их испарение с бумаги. Для эффективного разделения пигментов толщина бумаги должна быть равномерной, а сама бумага — обладать достаточной плотностью.

В настоящее время существуют несколько типов хроматографической бумаги, отличающихся по своим характеристикам: медленная, средняя, быстрая. Марки бумаги различаются также и по степени поглощения сухими волокнами воды, содержание которой колеблется в пределах от 115 до 195 %. В некоторых случаях для удаления загрязнений с бумаги её предварительно обрабатывают кислотой.

Материалы и оборудование. Листья растений, ацетон, бензин, петролейный эфир, дистиллированная вода, сульфат натрия прокаленный, насыщенный раствор  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , кварцевый песок, ножницы, ступки с пестиками, центрифужные градуированные пробирки, стеклянные фильтры №2, колбы Бунзена, пробирки химические с пробками, стаканы химические на 200 — 250 мл, делительные воронки, хроматографические камеры, хроматографическая бумага размером 16 × 4,6 см, фильтровальная бумага, вентилятор или фен, штативы для пробирок, нитки суровые, линейки, весы, КФК-2, набор кювет для КФК-2, насос.

Ход работы. Получите вытяжку пигментов из зеленых листьев растений одного яруса как описано в работе 1. Для этого используйте навеску 1,0 г и 100 %-й ацетон (или смесь: 24 мл ацетона и 6 мл бензина). Храните вытяжку в темном холодном месте. Полученный после фильтрования экстракт перенесите в делительную воронку и отмойте от ацетона аналогично работе 1.

Возьмите лист хроматографической бумаги размером 16 × 4,6 см и на одном его конце, отступив от края 1,5 см, проведите простым карандашом при помощи линейки тонкую линию и нанесите на нее исследуемую вытяжку одним из предложенных способов.

Первый способ. Бумагу зажмите между чистыми стеклянными пластинками (можно использовать предметные стекла) так, чтобы линия находилась выше пластин. Вдоль линии калиброванной пипеткой с оттянутым носиком нанесите 0,5 мл бензинового экстракта пигментов (в виде узкой полосы). Для анализа необходим сравнительно большой объем раствора, поэтому наносить раствор надо в несколько приемов: каждую следующую порцию после под-

сушивания предыдущей в токе воздуха от вентилятора или фена.

Второй способ. На дно химического стакана налейте исследуемую вытяжку и погрузите в нее хроматографическую бумагу. Подождите пока вытяжка поднимется до нанесенной карандашом линии, выньте бумагу и подсушите в токе воздуха от вентилятора или фена. Продолжайте наносить таким образом вытяжку еще 5-6 раз. Отметьте количество вытяжки, которое будет нанесено на хроматографическую бумагу. Затем на дно другого стакана налейте чистый растворитель и погрузите в него бумагу с вытяжкой, дождитесь пока растворитель поднимется до указанной отметки и подсушите в токе воздуха. Повторите эту операцию еще несколько раз, до тех пор, пока весь пигмент не достигнет нанесенной карандашом отметки.

После нанесения указанного количества вытяжки на расстоянии 0,4 см на противоположном краю хроматографической бумаги сделайте отверстие и закрепите лист на крышке сосуда для хроматографии. Подготовленную таким образом бумагу опустите в хроматографическую камеру со смесью растворителей следующего состава, мл: ацетон — 0,4, этанол — 0,6, петролейный эфир — 20. Лист хроматографической бумаги установите в цилиндре так, чтобы его нижний конец был опущен в смесь растворителей на 0,5 см, а края не касались стенок.

Через 40 мин наблюдается полное разделение пигментов. Достаньте хроматограмму из цилиндра и просушите при помощи вентилятора или фена. Затем обведите простым карандашом зоны с соответствующими пигментами и вырежьте их ножницами. Полоски разрежьте на мелкие кусочки и поместите в пробирки для элюирования: в первую — с хлорофиллом «b», во вторую — с хлорофиллом «a», в третью — с ксантофиллами, в четвертую — с каротинами. В каждую пробирку налейте по 5 мл ацетона. Элюируйте пигменты в течение 15 мин. В элюатах определите концентрацию пигментов на спектрофотометре или КФК-2, используя красный светофильтр для хлорофиллов, синий — для каротиноидов.

При использовании КФК-2 предварительно постройте калибровочный график для каротиноидов. В качестве стандартного используйте раствор  $K_2Cr_2O_7$  (58 мг  $K_2Cr_2O_7$  перенесите в мерную колбу на 200 мл и доведите водой до метки и тщательно перемешайте; 1 мл приготовленного раствора по окраске соответствует 2,35 мкг каротина и 2,52 мкг ксантофилла) или растворы каротиноидов, концентрацию которых можно определить на спектрофотометре.

Содержание пигментов в полученной вытяжке рассчитайте по формуле (мг/г массы сырых листьев):

$$X = \frac{C \cdot V \cdot u}{M \cdot n},$$

где  $C$  — концентрация пигмента, найденная по калибровочному графику, мг в 1 мл раствора;  $V$  — общий объем вытяжки, мл;  $u$  — объем элюата, мл;  $M$  — навеска листьев, взятая для анализа, г;  $n$  — объем вытяжки, нанесенный на хроматографическую бумагу, мл.

### **Разделение хлорофиллов и каротина методом бумажной одномерной хроматографии и их количественное определение (по Д.И. Сапожникову)**

**Материалы и оборудование.** Листья растений, ацетон, петролейный эфир, бензол, этанол, фарфоровая ступка с пестиком, воронка со стеклянным фильтром, колба Бунзена, стеклянные центрифужные градуированные пробирки, стеклянные палочки, химические стаканы на 200 – 250 мл, хроматографические камеры, хроматографическая бумага, линейка, карандаш, ножницы, канцелярские скрепки, портняжные булавки, весы, вентилятор, насос, КФК-2, набор кювет для КФК-2.

**Ход работы.** Получите вытяжку пигментов из зеленых листьев растений одного яруса как описано в работе 1. Для этого используйте навеску 1,0 г и 100 %-й ацетон. Храните вытяжку в темном холодном месте.

Затем для разгонки пигментов, находящихся в полученной вытяжке, приготовьте смеси растворителей следующего состава:

- первый растворитель: 37 мл бензола, 15 мл петролейного эфира;
- второй растворитель: 1,5 мл этанола (или 1 мл ацетона), 25 мл петролейного эфира.

Оба растворителя храните в сосудах с притертыми стеклами (место соприкосновения со стеклом осторожно смочите водой или смажьте вазелиновым маслом во избежание испарения растворителя), а перед началом работы поместите в хроматографические камеры для создания в них насыщенной атмосферы.

На следующем этапе работы приготовьте хроматографическую бумагу, размером 14 × 14 см и нанесите определенный объем вытяжки так, чтобы разгонка шла вдоль волокон бумаги. Для этого лист бумаги укрепите около вентилятора и, отступив 1 см от нижнего края и по бокам, нанесите объем полосой в несколько приемов, каждый раз ускоряя испарение растворителя с помощью вентилятора. Способ нанесения смотри в работе 4. Когда весь объем вытяжки нанесен, хроматограмму сверните в цилиндр и, скрепив булавкой в средней части или скрепками по бокам, поставьте в хроматографическую камеру с первым растворителем, тщательно закрыв её черным чехлом. Необходимо время от времени следить за фронтом растворителя. Когда фронт

пройдет 10-11 см, выньте хроматограмму, слегка подсушите и вырежьте полоску с каротином для элюции петролейным эфиром.

Оставшуюся часть хроматограммы перенесите в хроматографическую камеру со вторым растворителем и разгоняйте зеленые пигменты. После окончания разгонки хроматограмму подсушите и разрежьте для элюции зеленых пигментов. Порядок разделения пигментов от старта: хлорофилл «b», хлорофилл «a», виолаксантин, лютеин.

Для элюции разрежьте бумагу с содержащимися в ней зелеными пигментами на небольшие кусочки. Извлечение проводите в маленьком стаканчике этиловым эфиром. Раствор доведите в мерной пробирке до 5 мл. Определите оптическую плотность полученных элюатов на спектрофотометре.

#### Работа 5. ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ПИГМЕНТОВ ПОСЛЕ ИХ РАЗДЕЛЕНИЯ ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА БУМАГЕ

Введение. Спектры поглощения являются важнейшей характеристикой пигментов, на основании которой осуществляют идентификацию или качественный анализ, а также определяют их концентрацию (количественный анализ). С этой целью необходимо предварительно получить пигменты в спектрально-чистом состоянии.

Материалы и оборудование. Листья растений, фарфоровая ступка с пестиком, кварцевый песок, этанол, 80 %-й ацетон, бензол, петролейный эфир, серный эфир, насыщенный раствор NaCl, колба Бунзена, стеклянные градуированные центрифужные пробирки, стеклянные палочки, воронка со стеклянным фильтром, химические стаканчики на 50 мл, 100 мл, стеклянные пипетки на 1 мл и 5 мл, делительная воронка, капилляры, хроматографические камеры, хроматографическая бумага, фильтровальная бумага, ножницы, штатив для пробирок, штатив для пипеток, этижерки, весы, спектрофотометр, набор кювет для спектрофотометра, насос.

Ход работы. Получите вытяжку пигментов, как описано в работе 1. Для этого используйте навеску листьев в количестве 5 г и 80 %-й ацетон. Переведите пигменты из полученного экстракта в серный эфир (работа 1). Серноэфирный экстракт используйте для хроматографирования.

Хроматографическое разделение пигментов проводите на листах хроматографической бумаги размером 14 × 14 см, смонтированных сериями по 9 – 12 штук в этижерках. На каждый лист бумаги с помощью стеклянного капилляра нанесите полосой эфирный раствор пигментов и высушите его в токе холодного воздуха в течение 20 мин. Подготовленную этижерку поместите в прямоугольный стеклянный сосуд, в который предварительно налейте слоем до 1 см смесь растворителей, состоящую из ацетона и петролейного эфира в пропорции 1:7 (или бензина, петролейного эфира и ацетона в соотношении

10 : 2,5 : 2). Через 30 – 40 мин извлеките полученные хроматограммы из хроматографической камеры.

На хроматограмме пигменты распределятся в следующей последовательности, идя снизу вверх: хлорофилл «b», хлорофилл «a», ксантофиллы, каротины. Если исходные полосы на каждом листе содержали не слишком много вещества, то наблюдается довольно хорошее разделение смеси пигментов.

Вырежьте зоны хлорофиллов «a» и «b», каждый пигмент элюируйте из бумаги ацетоном, переведите в серный эфир и нанесите на свежие этикетки для повторного хроматографирования. На этот раз вместо полосы на угол каждого листа бумаги нанесите пятно, которое далее хроматографируйте в двух направлениях в следующих смесях:

- 1-е направление — смесь бензола, петролейного эфира и ацетона (3 : 1 : 0,05);
- 2-е направление — смесь этанола, петролейного эфира (1 : 7).

После третьего хроматографирования пятна хлорофиллов вырежьте вновь, элюируйте ацетоном и спектрофотометрируйте на спектрофотометре. Для этого ацетоновый экстракт пигментов поместите в кювету с длиной оптического пути 1 см. Концентрация хлорофилла в растворе должна соответствовать оптической плотности  $D$  в диапазоне 0,2 – 0,8. В этом случае ошибка измерения не будет превышать 5 %. Затем, установив длину волны проходящего через образец света  $\lambda = 400$  нм, определяйте величину  $D$  через каждые 5 нм, оканчивая измерения в области длин волн 720 – 730 нм.

На основании полученных измерений вычертите кривую зависимости оптической плотности (ось ординат) от длины волны проходящего света (ось абсцисс). Полученная кривая является спектром поглощения.

Получив спектр поглощения отдельных пигментов, выделенных из листьев растений (хлорофилл «b», хлорофилл «a», каротинов, ксантофиллов), вычертите результирующую кривую, которая в первом приближении будет характеризовать собой поглощательную способность (в спектральном отношении) зеленого листа по отношению к видимому свету.

#### Работа 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЖЕЛТЫХ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ПОСЛЕ ИХ РАЗДЕЛЕНИЯ ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА БУМАГЕ

не требуется полного разделения смеси всех пигментов на отдельные компоненты. Часто приходится проводить разделение только желтых пигментов или же только зеленых. В этих случаях удобно применять одномерные хроматограммы, нанося пигменты на бумагу в виде узкой полоски.

#### **Количественное определение каротина**

Материалы и оборудование. Листья зеленых растений, сернистый натрий, бензин, петролейный эфир, этиловый спирт, ацетон, этиловый эфир, фарфоровая ступка с пестиком, стеклянные центрифужные градуированные пробирки, колба Бунзена, воронка со стеклянным фильтром, стеклянные палочки, химические стаканы на 50 мл, хроматографические камеры, капилляры, мерные цилиндры на 25 мл, стеклянные пипетки на 10 мл, хроматографическая бумага, фильтровальная бумага, штатив для пробирок, штатив для пипеток, насос, КФК-2, набор кювет для КФК-2.

Ход работы. Из зеленых листьев растений приготовьте экстракт каротина по описанию работы 1. Для этого используйте навеску листьев в 200 мг и 20 – 25 мл смеси спирта и ацетона в соотношении 2:1. Для окончательного извлечения пигментов порошок промойте несколькими порциями этилового эфира.

Объем вытяжки измерьте в мерном цилиндре. Отделение каротина от других пигментов произведите на листе хроматографической бумаги, размером 14×14 см. Для этого капилляром в несколько приемов нанесите на бумагу в виде полосы шириной 0,5 см определенный объем вытяжки (1-2 мл) на расстоянии 1-2 см от нижнего края.

Бумагу с нанесенной на ней вытяжкой подсушите на воздухе до полного испарения растворителя, сверните в полый цилиндр и поместите в хроматографическую камеру, на дно которой налито 15 мл петролейного эфира. На время хроматографирования камеру прикройте притертой крышкой и накройте мешочком из темной материи. Во избежание вымывания каротина из стартовой полосы уровень растворителя должен быть ниже нижнего края полосы. Растворитель, поднимаясь по бумаге кверху, извлекает из полосы только каротин.

После того, как каротин отделится от других пигментов на 2-3 см, хроматографирование прекратите. Полоску бумаги с содержащимся на ней каротином отделите от остальной части листа и разрежьте на небольшие кусочки. Извлечение каротина из бумаги производите в маленьком химическом стакане или на стеклянном фильтре: нанесите 2-3 капли этилового эфира на бумагу на несколько минут, после чего его полностью извлеките с бумаги несколькими порциями смеси спирта с ацетоном (1:3). Раствор каротина доведите до 10 мл основным раствором.

Определите оптическую плотность полученной вытяжки на КФК за синим светофильтром, концентрацию пигмента определите по калибровочному графику для каротиноидов.

### **Количественное определение основных каротиноидов зеленых листьев**

Описываемая ниже методика позволяет количественно определить основ-

ные каротиноиды зеленых листьев: каротин, лютеин, виолаксантин и неоксантин. Из этих четырех каротиноидов неоксантин находится в минимальном количестве. Если принять сумму каротиноидов за 100 %, то на долю неоксантина в среднем приходится 10 – 15 %. Это обстоятельство приходится учитывать при выборе величины навески и объема экстрагирующего растворителя.

Оптимальное отношение растворителей в экстрагирующей жидкости определяется температурой окружающей среды и объемом хроматографической камеры. Эти два условия определяют то реальное их соотношение, которое устанавливается при достижении равновесия между двумя фазами – жидкой и газообразной. Так как смесь состоит из двух растворителей с различными точками кипения, то концентрация петролейного эфира, более низко кипящего, может сильно изменяться в зависимости от температуры и объема банки. При этом нужно руководствоваться следующим правилом: доля петролейного эфира в смеси растворителей должна быть тем больше, чем выше температура и больше объем банки. Перед началом работы рекомендуется опытным путем установить оптимальные соотношения указанных растворителей.

Материалы и оборудование. Листья зеленых растений, свежeproкаленный сернистый натрий, бензол, бензин, этиловый спирт, ацетон, этиловый эфир, фарфоровая чашка с пестиком, стеклянные центрифужные градуированные пробирки, колба Бунзена, воронка со стеклянным фильтром, стеклянные палочки, химические стаканы на 200 мл, мерные цилиндры на 50 мл, стеклянные пипетки на 10 мл, капилляр, хроматографические камеры, хроматографическая бумага, фильтровальная бумага, штативы для пробирок, штативы для пипеток, торсионные весы, насос, спектрофотометр, набор кювет для спектрофотометра, КФК-2, набор кювет для КФК-2.

Ход работы. Из зеленых листьев растений приготовьте экстракт каротина по описанию работы 1. Для этого используйте навеску листьев в 300 мг и 30 – 50 мл смеси спирта и ацетона в соотношении 2:1. Нанесите с помощью капилляра 2 мл полученной вытяжки пигментов на место стартового пятна. Каротин, лютеин и виолаксантин определяйте на одной хроматограмме, а неоксантин – на другой.

Первую хроматограмму разгоните смесью бензола и петролейного эфира в объемном отношении 3:1. Разгонку второй хроматограммы производите смесью бензола, петролейного эфира и этанола (96°) в объемных отношениях соответственно 18:6:1. Хроматограммы разгоняйте в течение 30 – 45 мин.

После разгонки хроматограммы подсушите, разрежьте на полоски с соответствующими пигментами и в воронке со стеклянным фильтром элюируйте из них пигменты смесью этанола и ацетона (1:3), предварительно обработав 1 мл этилового эфира. Объем полученных элюатов доведите основным рас-

творителем в мерной пробирке до 10 мл.

доведите основным растворителем в мерной пробирке до 10 мл. Определите для каждого пигмента оптическую плотность на концентрационном фотоэлектроколориметре КФК-2 за синим светофильтром или спектрофотометре (каротин при 450 нм, ксантофиллы — 445 нм). Рассчитайте концентрацию пигментов в вытяжке по калибровочному графику для каротиноидов или по формулам:

$$C_{\text{кар}} = \frac{D_{450}}{236}, C_{\text{кс}} = \frac{D_{445}}{215},$$

где  $C_{\text{кар}}$ ,  $C_{\text{кс}}$  — концентрация, г/л,  $D_{450}$ ,  $D_{445}$  — оптические плотности, 236, 215 — удельные коэффициенты погашения для каротина и ксантофиллов, соответственно.

# Глава 5

## Дыхание

### 5.1 Подготовка растительного материала для изучения окислительных процессов

Для определения интенсивности дыхания в ряде случаев может быть использован объект в целом виде, как, например, семена, проростки. Часто используют также отдельные органы растения, кусочки или срезы тканей.

Для манометрических исследований листьев из них вырезают диски сверлом с диаметром 4–7 мм или лист разрезается на части примерно той же величины, что и диски. Проба составляется из нескольких листьев с разных растений (средняя проба). Необходимо следить, чтобы части листа не подсыхали, для этого их можно помещать в чашку Петри с влажной фильтровальной бумагой на крышке.

При использовании корней молодые корешки (диаметром не больше 2 мм) режутся на части длиной 5–7 мм, из корней большего диаметра приготавливаются поперечные срезы толщиной 1–2 мм. Приготовленные части корня помещают в жидкость, состав которой зависит от целей определения (например, питательный раствор, буферный раствор и др.).

Для ряда органов, например клубней картофеля, корней моркови с плотными паренхимными тканями, рекомендуется определение проводить на срезах (дисках) ткани, взвешенных в жидкой среде.

**Срезы тканей** Нередко энзимологические исследования проводят на срезах растительных тканей. Это позволяет судить об активности ферментов в сравнительно неповрежденной ткани без нарушения целостности структуры клетки. Однако различная проницаемость тканей для субстратов и других кофакторов реакции в какой-то мере ограничивает применение этого метода.

Техника приготовления: срезы ткани толщиной около 1 мм можно делать

с помощью лезвия безопасной бритвы. Приготавливаемые срезы во избежание высыхания прикрывают влажной фильтровальной бумагой.

Полученная масса срезов промывается в течение 10 мин под струей водопроводной воды для полного удаления содержимого разрушенных клеток, затем срезы промываются дистиллированной водой и тщательно обсушиваются фильтровальной бумагой. Из массы срезов берется навеска.

**Тканевые «гомогенаты»** Навеска растительной ткани (средняя проба) растирается на холоду с соответствующим буферным раствором (или другим, в зависимости от цели). Растиртая масса переносится в мерную колбочку и доводится до определенного объема буферным раствором.

Полученный гомогенат ткани может быть использован непосредственно в ряде исследований. Необходимо следить, чтобы при взятии пробы из колбочки растиртая масса была равномерно распределена во всем объеме.

**Экстракты ткани** Полученный, как описано выше, гомогенат настаивается в течение 30 мин, а затем центрифугируется при 3–4 тыс. об/мин в течение 5–10 мин. Работа ведется со слитой с осадка надосадочной жидкостью.

В некоторых случаях гомогенат можно фильтровать или дать отстояться, и осторожно слить раствор.

Необходимо подчеркнуть, что одним из наиболее важных условий получения активных энзиматических препаратов является проведение всех подготовительных операций на холоду (около 0°C). Для этого ступки, колбы, центрифужные стаканы должны быть охлаждены. Растирание проводят в холодной комнате или на льду. Настаивается раствор также на холоду.

Растирание ткани может проводиться в ступке, в различного типа гомогенизаторах или размельчителях. Преимущество того или иного способа размельчения ткани зависит от рода ткани, величины навески и цели исследования.

### 5.1.1 Метод вакуум-инfiltrации

Данный метод позволяет ввести в межклеточные пространства живой ткани те или иные вещества (что облегчает их проникновение в клетку), превращение которых или их влияние на различные процессы жизнедеятельности составляет задачу исследования.

Навеска ткани (средняя проба) завертывается в сетчатый материал и помещается в стаканчик, куда наливается раствор изучаемого вещества. Необходимо, чтобы еще 2–3 см высоты раствора находилось над погруженной в

него навеской. Завернутая навеска должна быть слегка придавлена небольшим грузиком, чтобы инфильтрируемый материал не всплывал на поверхность раствора. Затем стаканчик помещают в вакуум-эксикатор и крышка эксикатора хорошо притирается. К эксикатору подключают электрический масляный насос. В течение 20–30 мин из эксикатора откачивают воздух. Разряжение должно быть в 20–40 мм ртутного столба. Величина его зависит от инфильтрируемого материала. В этих условиях происходит удаление воздуха из межклетников. О конце откачивания судят по прекращению выделения пузырьков воздуха в стаканчике с навеской.

Для того чтобы раствор не разбрызгивался, стаканчик прикрывают воронкой (без длинного носика). Это особенно необходимо в том случае, когда одновременно инфильтрируются разные реагенты, иначе капли раствора из одного стаканчика могут попасть в другой.

После откачивания воздуха в течение 20–30 мин кран эксикатора закрывают. Только после того, как кран эксикатора закрыт, отсоединяют шланг насоса, затем медленно открывают кран и воздух постепенно (в течение 1–2 мин) входит внутрь. Увеличивается давление над раствором, в результате чего раствор проникает в межклетники.

После уравнивания давления растительный материал оставляют еще 2–3 мин в растворе, так как проникновение раствора продолжается еще в течение этого времени.

Навески вынимают из раствора, быстро споласкивают водопроводной водой и обсушивают фильтровальной бумагой. Растительный материал должен некоторое время подсохнуть на воздухе или лучше в токе теплого воздуха, до первоначальной влажности.

Подготовленные таким образом навески растительного материала используются в дальнейших операциях.

### **5.1.2 Выделение функционально активных структурных компонентов клетки**

Проникновение в микромир живого связано на современном этапе развития физиологии и биохимии в большой мере с изучением структурных компонентов клетки и происходящих в них процессов. В настоящее время вопросы транспорта электронов в акте дыхания и фотосинтеза, механизма запасаения и использования энергии, вопросы синтеза белка и нуклеиновых кислот решаются с использованием различных методов выделения клеточных структур (митохондрий, хлоропластов, ядер, пероксисом, рибосом и др.) и их фрагментов. В связи с этим, знание различных методов выделения функционально активных структурных компонентов клетки необходимо каждому

физиологу, биохимику и биофизику, изучающему процессы обмена веществ, происходящих в клетке.

В данном разделе описываются современные наиболее распространенные методы выделения митохондрий, ядер и хлоропластов, связанных с функцией дыхания, а также достоинства и недостатки этих методов. Одним из современных и совершенных методов выделения структурных компонентов клетки является применение дифференциального центрифугирования и градиента плотности сахарозы.

### Работа 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫХ МИТОХОНДРИЙ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

В последние 20 лет развитие исследований по структуре и функции митохондрий привело к созданию самостоятельного раздела науки — митохондриологии.

Получение функционально активных митохондрий и изучение физиолого-биохимических свойств митохондрий растительных тканей началось значительно позже, чем митохондрий животных. Это связано с большими трудностями при выделении функционально активных митохондрий из растительных и особенно зеленых тканей, так как зеленые ткани содержат большое количество специфических соединений, которые становятся ингибиторами активности митохондрий при гомогенизации ткани, необходимой для их выделения (сюда можно отнести различные жирные кислоты, многочисленные фенолы, продукты их окисления и множество других соединений). В связи с этим для выделения функционально активных митохондрий из растительных тканей применяют специальные добавки: например, поливинилпирролидон для связывания фенолов, стабилизации морфологической целостности митохондрий и сохранения их энзиматической активности.

В большинстве случаев для получения активных митохондрий в среду выделения добавляют большое количество альбумина (3%-ная концентрация альбумина используется в среде выделения митохондрий из листьев табака, 5%-ная концентрация применяется для выделения митохондрий из листьев хлопчатника, содержащего большое количество госсипола). Имеются множество других специфических особенностей, свойственных определенным видам растений и затрудняющих выделение активной фракции митохондрий.

Получение функционально активных митохондрий зависит от многих факторов. Прежде всего способ размельчения растительной ткани должен быть быстрым, но не грубым. Большинство исследователей для измельчения используют ступку. Наиболее активные митохондрии из плодов томата удалось выделить, разрезая ткань бритвой, что, по-видимому, позволяет получить большее количество неповрежденных митохондрий, свободных от примесей.

Митохондрии, изолированные при растирании ткани в ступке, менее активны. При измельчении мягких листовых тканей растений в гомогенаторе были получены митохондрии, не обладающие дыхательным контролем (ДК) на АДФ (см. раздел «Дыхательный контроль»). В то же время гомогенатор успешно применяют для измельчения грубых тканей, например, плодов, корнеплодов и др.

Для осаждения митохондрий из гомогената обычно используют центрифугирование при 10 000–20 000 g в течение 15–30 мин. Икума и Боннер (36) исследовали свойства изолированных митохондрий гипокотилей бобов маша в зависимости от седиментационной силы. В их опытах активная фракция митохондрий осаждалась при 10 000 g после промывания — при 6000 g. Перед осаждением промытых митохондрий авторы применяли низкоскоростное центрифугирование (250 g), что уменьшало загрязнение митохондриального осадка крахмалом.

Среда выделения митохондрий обычно содержит сахарозу или маннит 0,4–0,5 М, трис- или фосфатный буфер pH 7,0–7,4; ЭДТА 0,001М–0,005 М и аскорбат  $\text{Na } 10^{-4}$  М. Применение сахарозы или маннита необходимо для создания тоничности среды, так как митохондрии легко повреждаются при помещении их в гипотоническую или сильно гипертоническую среду. Фосфорилирующая и окислительная активность митохондрий почти полностью инактивируется при помещении их в гипотонический раствор сахарозы (маннита) или при помещении в дистиллированную воду. При выделении митохондрий из различных растительных объектов и в дальнейшей работе с ними среда должна быть слабо гипертонична. Чаще всего применяют сахарозу 0,4–0,5 М. Однако в некоторых случаях для выделения митохондрий используют сахарозу 0,3–0,6М. Маннит можно использовать вместо сахарозы в аналогичной концентрации или в сочетании с сахарозой. Например, для выделения митохондрий из клубней картофеля применяют сочетание 0,25 М сахарозы и 0,35 М маннита. Маннит в сочетании с сахарозой давал возможность лучше отделять суспензию митохондрий от крахмала, чем при работе с одной сахарозой. В ряде работ, особенно при выделении митохондрий из растительных объектов, содержащих большое количество фенольных соединений, наряду с сахарозой используют поливинилпирролидон, стабилизирующий морфологическую целостность, энзиматическую активность и способствующий лучшему отделению митохондриальной фракции от микросом, предотвращая агрегацию микросомальных частиц. Лучшие результаты получены при использовании поливинилпирролидона в 10 %-ной концентрации наряду с изотоничной средой сахарозы. Применение поливинилпирролидона без сахарозы не дало положительного эффекта.

Применение концентрации сахарозы больше 0,5 М снижает энзиматиче-

скую активность митохондрий, в частности сукциноксидазную активность.

Ингибирование, вызываемое высоким осмотическим давлением среды, объясняется, по-видимому, уменьшением проницаемости митохондрий для молекул субстрата. Иногда при выделении митохондрий для создания тоничности среды сахарозу заменяют хлористым калием.

Добавление ЭДТА к среде выделения способствует рассеиванию примесей, загрязняющих осадок митохондрий, и связыванию ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , которые освобождаются при разрушении ткани. Эффект от добавления ЭДТА наиболее значителен при работе с тканями, имеющими сильно вакуолизированные клетки. Хелатирующее действие ЭДТА связывают с полианионными свойствами его молекулы, содержащей четыре карбоксильных группы. Опыты показали, что ЭДТА практически не может быть заменен другим комплексом. Однако показано, что аналогично ЭДТА действует лимонная кислота, которая обладает структурой и свойствами (благодаря наличию трех карбоксильных групп), подобными ЭДТА. Лимонная кислота является одновременно и субстратом окисления и комплексом. Пиерпоинт, выделяя митохондрии из листьев табака и люпина, вносила лимоннокислый натрий (0,02 М) в среду выделения. Исключение цитрата из среды значительно снижало (до 60–70%) энзиматическую активность митохондрий, особенно сукциноксидазную.

Фосфорилирующая активность митохондрий увеличивается при добавлении в среду альбумина в разных концентрациях в зависимости от объекта (от 0,5 до 5%). Альбумин связывает так называемые естественные разобщители (ненасыщенные жирные кислоты), присутствующие в растительных тканях и освобождающиеся при их растирании. 5%-ная концентрация бычьего сывороточного альбумина (БСА) нейтрализует эти вещества во время их выделения. Это особенно успешно применяется при выделении митохондрий из листьев хлопчатника, из корней проростков гороха, содержащих большое количество ненасыщенных жирных кислот.

Цистеин используется в среде выделения митохондрий многими исследователями. Для выделения митохондрий из клубней картофеля цистеин добавляется в среду для препятствия окисления хлорогеновой кислоты. Таким образом цистеин оказывает действие, аналогичное аскорбиновой кислоте, предотвращая окисление фенолов. Цистеин и аскорбиновая кислота способствуют набуханию митохондрий и в связи с этим для снижения их отрицательного действия в среду выделения одновременно вносится ЭДТА.

Получение функционально активных митохондрий также зависит от времени изоляции. Как правило, процедура выделения митохондрий не должна превышать 1,5–2 ч. Например, митохондрии пшеницы обладают большим дыхательным контролем и стабильны в течение 3 ч, если время их выделе-

ния сократить до 10,5 мин. Таким образом, для того чтобы получить функционально активные митохондрии (структурно неповрежденные), необходимо тщательно подобрать компоненты среды выделения (а также промывания и инкубации), концентрацию компонентов среды и рН. Наиболее успешные результаты в выделении активных митохондрий удается получить, хорошо зная свойства ткани, из которой изолируются митохондрии.

Необходимо подчеркнуть, что одним из важных факторов, помимо среды выделения и инкубации, является изоляция митохондрий в холодной камере при температуре 0–4°C с охлажденными растворами и посудой. Процесс выделения митохондрий может иметь свои особенности в зависимости от специфики объекта, а также от того, для какой цели предполагается использовать выделенные митохондрии.

Фракцию митохондрий, используемую затем для определения фосфорилирующей активности, необходимо выделять довольно быстро. Для этой цели очень часто используют методы выделения митохондрий дифференциальным центрифугированием без градиента плотности, применение которого значительно увеличивает время изоляции. Однако для более точных исследований митохондрий, когда необходимо установить долю того или иного компонента дыхательной цепи (который может быть локализован и в других фракциях, а не только в митохондриях), необходимо выделить наиболее чистую фракцию митохондрий, свободную от различных примесей (микросом, остатков хлоропластов и др.). В таком случае наряду с дифференциальным центрифугированием следует применять градиент плотности сахарозы.

Трудность работы с митохондриями определяется их большой гетерогенностью, различным функциональным состоянием, связанным с возрастом и конкретными условиями, в которых находится исследуемое растение. В настоящее время установлено, что митохондрии, обладающие фосфорилирующей способностью, относятся к наиболее крупной фракции. В связи с этим осаждение митохондрий для определения фосфорилирования проводится при относительно низких скоростях центрифугирования для растительных митохондрий (7800–8000 для животных тканей, не содержащих пластидных компонентов, выделение митохондрий осуществляют при более низких скоростях (порядка 6000 g и меньше).

Чистоту митохондриальной фракции можно определять несколькими способами:

- можно применять биохимический контроль, определяя ферментативную способность митохондрий (например, специфическую для митохондрий сукциноксидазу);
- фиксация и просмотр митохондриальной фракции в электронный мик-

роскоп;

- наиболее простой способ, просмотр митохондриальной фракции в фазовоконтрастный микроскоп.

С помощью фазовоконтрастной микроскопии можно установить отсутствие загрязнения частицами больших размеров, как ядра, целые клетки или их обломки и т. п. Однако этот способ контроля не является идеальным. Наиболее совершенным критерием чистоты структурных компонентов клетки, в том числе и митохондрий, является электронно-микроскопический контроль.

При выделении митохондрий из этиолированных тканей и корней легче получить малозагрязненную фракцию митохондрий, так как лейкопласты, не имея гранулярной структуры, мало разрушаются при гомогенизации ткани. Хлоропласты, напротив, обладая гранулярной структурой, легко подвергаются разрушению. Фрагменты хлоропластов (граны) по размерам и плотности очень сходны с митохондриями, что затрудняет их разделение при дифференциальном центрифугировании. В связи с этим фракция митохондрий из зеленых тканей получается сильно загрязненной фрагментами хлоропластов и требует дополнительной очистки в градиенте плотности сахарозы. Считается, что низкая биохимическая активность митохондрий из зеленых тканей объясняется, вероятно, наличием в этой фракции большого количества примесей, так как расчет ведется на весь белок фракции (включая белок митохондрий и примесей). Таким образом работа с митохондриями из растительных тканей особенно с митохондриями хлорофиллоносных тканей сопряжена с дополнительными трудностями и применением специальных методов очистки.

### **Выделение митохондрий из этиолированных проростков кукурузы**

Отрезанные четырехдневные этиолированные проростки кукурузы (выращенные в темноте на влажной фильтровальной бумаге при температуре +25°C) помещают на 20–30 мин в холодную камеру (0–4°C), затем растирают в охлажденной фарфоровой ступке с охлажденной средой выделения. Полученный гомогенат отжимают через двойной слой полотна, затем центрифугируют при 2500–3000 g в течение 10 мин. Осадок отбрасывают. Надосадочную жидкость центрифугируют при 9000 g в течение 15 мин. Осадок промывают средой выделения и центрифугируют вторично при 9000 g 15 мин. Осадок суспендируют с помощью мягкой кисточки в среде суспендирования.

Среда выделения митохондрий: сахароза 0,5 М, ЭДТА 0,005 М, калий-фосфатный буфер 0,13 М, рН 7,4.

### **Выделение митохондрий из корней проростков кукурузы**

5–10 г корней четырех-пятидневных проростков кукурузы отрезают и помещают на 20–30 мин в холодную камеру при температуре 0–4°C. Затем корни растирают в охлажденной ступке с охлажденной средой выделения.

Среда выделения: сахароза 0,5М, ЭДТА 0,005М, калий фосфатный буфер 1/15 М, рН 7,4.

Растиертую массу отжимают через полотно и центрифугируют методом дифференциального центрифугирования:

1. при 3000–4000 g — 10 мин. Осадок, содержащий ядра, клеточные стенки и пластиды отбрасывают, надосадочную жидкость центрифугируют;
2. при 8000–9000 g — 15 мин;
3. полученный осадок митохондрий промывают в двухкратном объеме среды выделения и центрифугируют вторично при 8000–9000 g 15 мин. После осаждения митохондрии суспендируют (мягкой кисточкой) в среде, содержащей следующие компоненты: сахароза 0,5 М, калий-фосфатный буфер 1/15 М, рН 7,0.

Суспензию митохондрий до опыта хранят в ледяной бане (не более 5–10 мин) и затем используют для физиолого-биохимических анализов.

Вся процедура выделения митохондрий проводится в холодной камере при температуре 0–4°C и не должна превышать 1–1,5 ч.

### **Выделение функционально активных митохондрий из зеленых листьев с применением градиента плотности сахарозы**

С митохондриями, выделенными из листьев взрослых вегетирующих растений, проведено относительно небольшое число исследований. Это объясняется малым содержанием митохондрий в листьях, сильным загрязнением фракции митохондрий фрагментами хлоропластов.

Для выделения митохондрий берут листья второго яруса, считая сверху, с растений, имеющих 4–5 ярусов. Однако необходимо подчеркнуть, что взрослые вегетирующие растения в период цветения и бутонизации обладают чрезвычайно низкой фосфорилирующей активностью. В связи с этим в анализ берут листья с растений до бутонизации и цветения.

Навеску растительного материала (15 г листьев без средней жилки) помещают в холодную камеру на 20–30 мин. Затем листья растирают в ступке с охлажденной средой выделения (четырекратный объем по сравнению с навеской — на 15 г 60 мл среды).

Среда выделения: сахароза 0,5 М, калий-фосфатный буфер 0,13 М, рН 7,0, ЭДТА 0,005 М, поливинилпирролидон 5–10%-ный.

Гомогенат отжимают через полотно и центрифугируют:

1. при 5000 g 10 мин. Осадок, содержащий ядра, клеточные стенки, хлоропласты отбрасывают;
2. надосадочную жидкость центрифугируют при 9000 g 15 мин. Осадок митохондрий промывают в двухкратном объеме среды выделения;
3. центрифугируют вторично при 9000 g 15 мин.

Очистку митохондрий проводят в ступенчатом градиенте плотности сахарозы. Ступенчатый градиент создается путем помещения среды различной плотности слоями один на другой в порядке снижения плотности.

Обычно используют градиент от 1,76 М до 0,3 М сахарозы. Однако можно использовать и менее сложный градиент, начиная с концентрации сахарозы от 1,1 М.

Для очистки митохондрий с помощью градиента осадок митохондрий суспендируют в 2 мл 0,4 М сахарозы, приготовленной на калий-фосфатном буфере 0,13 М, рН 7,5 и наносят на градиент, состоящий из следующих слоев сахарозы: 1,1 М — 7 мл, 0,8 М — 15 мл, 0,5 М — 15 мл, 0,3 М — 10 мл, приготовленных на 0,013 М фосфатном буфере, рН 7,5. Градиент готовится предварительно и выстаивается на холоду в течение 3 ч.

Центрифугирование митохондрий в ступенчатом градиенте проводят на холоду при 3000 g в течение 30 мин на центрифуге с бакетным ротором, в отличие от обычной центрифуги с угловым ротором.

Митохондрии, находящиеся в слоях 0,5–0,8 М сахарозы отбирают шприцем и осаждают при 9000 g в течение 20 мин. Полученный осадок митохондрий используют для физиолого-биохимического изучения. Митохондрии с помощью мягкой кисточки суспендируют в 0,5 мл среды, содержащей следующие компоненты: сахароза 0,5 М, калий-фосфатный буфер 0,013 М, рН 7,0.

Суспензию митохондрий до опыта хранят в ледяной бане (не более 10–15 мин).

Существует множество рецептов приготовления сахарозных линейных градиентов для выделения митохондрий. В связи с этим можно предложить несколько другой рецепт сахарозного градиента следующего состава: 1,1 М — 7 мл; 0,8 М — 14 мл; 0,5 М — 15 мл; 0,4 М — 7 мл. Митохондрии, нанесенные на градиент, центрифугируют при 3500 g в течение 30 мин. После центрифугирования 4-й слой отбирают с помощью шприца и центрифугируют при 10 000 g 15 мин.

Полученный после центрифугирования осадок митохондрий суспендируют в соответствующей для каждого анализа среде (0,5–2,5 мл) и используют в опыте. Для большинства физиолого-биохимических методов исследования

описанные способы выделения митохондрий наиболее оптимальны. Однако в некоторых исследованиях применяемые методы выделения характеризуются специфическими особенностями, необходимыми для данного конкретного случая.

## 5.2 Манометрический метод определения интенсивности дыхания

Для характеристики дыхательного газообмена используют следующие показатели:

1. интенсивность поглощения кислорода,
2. интенсивность выделения углекислого газа,
3. величину дыхательного коэффициента.

Методы определения этих показателей возможно осуществлять на газометрическом приборе Варбурга.

### Работа 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ КИСЛОРОДА

Навеску растительного материала (300–500 мг) помещают в основное пространство сосудика. Навеска должна представлять среднюю пробу.

При работе с листьями из них пробочным сверлом вырезают диски диаметром 0,5–0,7 см или разрезают листья на кусочки. При работе с корешками или водными растениями навеска помещается в жидкость, состав которой может зависеть от схемы опыта (питательный раствор, буферный раствор и др.). При объеме сосудиков около 25 мл объем жидкости, например, 1,5–2 мл.

Во внутренний стаканчик наливают 0,3–0,5 мл 20%-ного раствора КОН и вставляют КОН-бумажку. При отсутствии центрального стаканчика КОН наливают в боковой отросток.

Боковые отростки сосудика закрываются пробкой (шлифы пробки и сосудика обязательно притираются). Сосудики надеваются на заранее смазанные шлифы манометров и также тщательно притираются. Хорошо притертые шлифы прозрачны. На отростки сосудиков и манометров надеваются резиновые кольца, поддерживающие сосудики.

Манометры с сосудиками ставят в термостатную ванну, краны манометров должны быть открыты. Включают систему качания.

Постоянная температура в ванне устанавливается заранее.

Измерение газового давления начинается только через 20–30 мин. После уравнивания температуры сосудика и ванны необходимо остановить качание, установить уровень манометрической жидкости в правом колене на деление 15 (150 мм), отметить положение мениска в левом колене манометра. В некоторых манометрах деления в левом и правом колене не всегда совпадают. Это возможно тогда, когда у манометра после ремонта сместилась шкала или диаметр капилляра в левом и правом колене различен.

Затем закрывают кран манометра и снова включают качание. Отмечают время начала опыта. Одновременно с опытными сосудиками ставят термобарометры.

Опыт следует проводить в двух-трехкратной повторности.

При определении интенсивности дыхания отсчеты снимают через 20–30 мин в течение 1–2 ч (3–4 отсчета). В случае необходимости измерения можно проводить более длительное время.

Для того чтобы снять отсчет, отключают качание, уровень жидкости в правом колене доводят до деления 15 (150 мм) и отмечают положение мениска в левом колене.

Учитывая исходное (нулевое) показание манометра, определяют величину смещения уровня манометрической жидкости за время опыта.

Вводят соответствующую поправку на показание термобарометров. Умножив полученное значение на константу сосудика, получают количество поглощенного кислорода в обычных единицах.

После окончания опыта открывают краны манометров и только после этого снимают манометры с сосудиками с ванны и ставят их на специальные штативы. Если снять манометр, не открыв кран, то из-за быстрого понижения температуры манометрическая жидкость может быть переброшена в сосудик и тогда снова придется промывать и перезаряжать манометр. Сосудики снимают с манометров и моют их.

Расчеты могут быть суммарными или дифференциальными. В первом случае результат вычисляется от начала опыта до первого отсчета (например, за 30 мин), затем от начала опыта до второго отсчета (за 60 мин) и т. д. При дифференциальном способе расчета получают результат за каждый отрезок времени, для чего из последующего результата вычитают предыдущий. Последний способ расчета применяется главным образом в том случае, когда необходимо проследить за динамикой процесса. При определении интенсивности поглощения кислорода, которая выражается в микролитрах поглощенного кислорода за час, используют суммарный способ расчета. Результат, полученный за более длительный промежуток времени, например за 1,5–2 ч, позволяет избежать некоторые погрешности кратковременных определений.

При более сложной схеме опыта иногда удобнее рассчитывать констан-

ту для одного сосудика (который будет являться стандартным), а показания других сосудиков приводят к объему этого стандартного сосудика. Для этого  $H$  каждого сосудика умножается на  $V_g$  данного сосудика и делится на  $V_g$  стандартного сосудика, затем результаты умножаются на константу стандартного сосудика.

### Работа 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА

Манометрический метод позволяет одновременно определять и поглощение кислорода и выделение углекислого газа.

Для определения  $CO_2$  существуют различные методы, наиболее простым из которых является прямой метод Варбурга.

Для определения количества выделяющегося  $CO_2$  необходимо ставить сосудики с КОН в центральном стаканчике и без КОН. В этом случае в стаканчик наливают  $H_2O$ .

В сосудиках с КОН изменение объема газа происходит за счет поглощения  $O_2$ , так как выделяющийся  $CO_2$  поглощается щелочью. В сосудиках с водой изменение объема газа происходит за счет соотношения объемов поглощаемого кислорода и выделяющегося углекислого газа. Так, если в сосудиках с водой происходит увеличение объема газа, то отношение  $CO_2/O_2$  больше 1, показание такого сосудика зависит от величины разницы объемов  $CO_2$  и  $O_2$ . Таким образом для расчета объема  $CO_2$  необходимо сложить значения сосудиков со щелочью и с водой.

Если в сосудиках с водой происходит уменьшение объема газа, то отношение  $CO_2/O_2$  меньше 1. Объем  $CO_2$  в данном случае следует рассчитывать по разнице показаний между сосудиками со щелочью и с водой.

Таким образом, для расчета объема выделяющегося  $CO_2$  следует брать арифметическую разницу ( $V$ ) между сосудиками со щелочью и с водой.

Так как объемы сосудиков с КОН и без щелочи могут быть разными, то подобный расчет может быть произведен только после приведения показаний манометров  $H$  к объему стандартного сосудика.

При необходимости выражения результатов в весовых единицах количество миллилитров или микролитров  $O_2$  умножают на 1,429, а  $CO_2$  на 1,977, результаты соответственно получают в миллиграммах или микрограммах.

1,429 и 1,977 вес 1 л соответственно кислорода и углекислого газа в граммах при  $0^\circ C$  и 760 мм рт. ст.

**Вычисление дыхательного коэффициента (ДК)** Одновременное определение интенсивности поглощения  $O_2$  и выделения  $CO_2$  позволяет рассчитать дыхательный коэффициент.

Дыхательный коэффициент равен отношению количества выделяемого при дыхании углекислого газа к количеству поглощаемого кислорода:

$$\text{ДК} = \frac{CO_2}{O_2}.$$

### 5.3 Ферментные системы дыхания

Источником энергии, необходимой для жизнедеятельности клетки, служат потребляемые ею питательные вещества. Распад этих веществ в результате окислительно-восстановительных реакций сопровождается освобождением энергии, а также образованием химически активных метаболитов, которые используются клеткой при выполнении всех её жизненных функций.

Практически все реакции в живых организмах сами по себе идут с недостаточной скоростью. Скорость этих процессов неизмеримо возрастает в результате участия в них специфических биологических катализаторов — ферментов. Ферменты контролируют скорость различных реакций и таким путем регулируют обмен веществ организма в целом.

Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные превращения дыхательных субстратов, могут быть разделены на четыре группы.

1. Активаторы водорода (дегидрогеназы).
2. Активаторы кислорода (оксидазы).
3. Ферменты, выполняющие роль промежуточных переносчиков водорода (электронов).
4. Вспомогательные ферменты.

Ферментативные окислительно-восстановительные превращения, дыхательного субстрата в подавляющей своей части требуют предварительной подготовки субстрата. Сущность такой подготовки состоит в преодолении химической инертности молекулы субстрата, её активации, в результате чего она становится доступной непосредственному воздействию окислительно-восстановительной системы. Процесс предварительной подготовки субстрата осуществляется при участии целого комплекса ферментов, которые могут быть отнесены к группе вспомогательных. Роль, выполняемая этими ферментами, является как бы вспомогательной по отношению к собственно окислительно-восстановительным ферментам. Без предварительной подготовки превращения дыхательного субстрата либо неосуществимы, либо идут с предельно низкими скоростями.

Комплекс ферментов, связанных с дыханием, у растительных организмов чрезвычайно сложен, причем, как правило, одна и та же функция осуществляется не одним, а несколькими ферментами разной химической природы с разным механизмом действия. Принцип множественности, лежащей в основе построения ферментативных систем дыхания растений, осложняется наличием множества молекулярных форм (изоэнзимов), что имеет важное биологическое значение. В результате достигаемой таким путем гетерогенности неизмеримо возрастает гибкость всего дыхательного аппарата растения, увеличивается разнообразие путей переноса электронов в дыхательной цепи. Этот принцип обеспечивает одну из важнейших особенностей каталитического аппарата растений — его способность к адаптивной изменчивости в соответствии с изменениями условий существования организмов.

### 5.3.1 Приготовление белковых препаратов

**Ацетоновые белковые препараты** Навеска растительной ткани 10–20 г гомогенизируется в гомогенизаторе с охлажденным до минус 10°С ацетоном. Полученная масса переносится на фильтр в воронку Бюхнера и экстрагируется с отсасыванием двадцатикратным, по отношению к весу сырого материала, количеством охлажденного ацетона. Необходимо следить, чтобы температура ацетона не поднималась выше минус 10° С.

Полученный осадок высушивается над серной кислотой в вакуум-эксикаторе. Препараты хранятся в холодильнике в вакуум-эксикаторе. Срок хранения зависит от исследуемого фермента. Активность ряда ферментов сохраняется при хороших условиях хранения довольно долго.

Перед определением ацетоновый препарат растирается на холоду с буферным раствором, доводится до определенного объема и настаивается на холоду 30–60 мин, после чего раствор центрифугируется при 9000–10 000 об/мин в течение 10 мин в рефрижераторной центрифуге.

Подобная фиксация тканей позволяет удалить липиды, пигменты, липиды, связанные с белками, что ведет к выделению белка из белково-липидного комплекса. Следует отметить, что ряд ферментов при приготовлении ацетоновых препаратов денатурируют или меняют конфигурацию.

**Фракционное осаждение ферментного белка ацетоном и сернокислым аммонием** Осаждение полифенолоксидазного белка ацетоном разработано для тканей корней моркови.

Измельченная ткань заливалась фосфатным буферным раствором 1/15 M, pH 7,7 в отношении 1:1, настаивалась при +40° С в течение 1 ч. Полученная масса затем фильтровалась и отжималась через капроновую ткань.

Фильтрат центрифугировался при 20 000 об/мин в течение 20 мин на вакуумной рефрижераторной центрифуге.

К надосадочной жидкости приливался по каплям (при постоянном помешивании с помощью магнитной мешалки) охлажденный до минус 7°С – минус 10°С ацетон в отношении 1 : 1,5 (ацетон : ферментный раствор). Необходимо следить, чтобы раствор не замерзал. Осадок немедленно отделялся на воронке Бюхнера, промывался на фильтре холодным ацетоном до обесцвечивания и высушивался под вакуумом. Подобная операция позволяет удалить каротин, а также белки, не осаждаемые при полученной концентрации ацетона. Отделение осадка может проводиться центрифугированием. Тогда несколько раз осадок промывается охлажденным ацетоном с последующим центрифугированием. Во время процедуры отделения и промывания осадка температура его не должна опускаться ниже –10°С.

Часто фракционирование ферментных белков осуществляется солями. В основе этого метода лежит то, что различные белки осаждаются при разных концентрациях соли. Повышая концентрацию соли в растворе, можно получить ряд белковых фракций. Зная, в каких примерно пределах концентрации соли выпадает исследуемый белок, можно осадить и отделить белки, осаждаемые при более низкой концентрации, а затем отделить фракцию с исследуемым ферментом. Для этой цели чаще всего употребляется сернокислый аммоний. Используют или мелко растертую сухую соль или насыщенный раствор. Концентрацию соли обычно выражают в процентах от полного насыщения раствора при комнатной температуре, имея в виду, что насыщенный раствор имеет 100%-ное насыщение.

Далее полученный осадок растворяют и удаляют сернокислый аммоний диализом или методом гель-фильтрации.

#### Работа 4. ВЫДЕЛЕНИЕ *o*-ДИФЕНОЛОКСИДАЗНЫХ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ

Реактивы:

- Сефадекс G-200 или биогель P-300;
- фосфатный буферный раствор 1/15 М, рН 7,7;
- ацетон (свежеперегнаный).

**Ход работы** Получают ацетоновый препарат фермента так, как это описано на стр. 275. 200–250 мг препарата растворяют в 2–3 мл фосфатного буфера рН 7,7. Полученный раствор наносят на колонку с биогелем P-300 (можно с сефадексом G-200).

Для приготовления колонки берут навеску сухого биогеля 5 г и заливают 300 мл воды, взбалтывают, дают раствору отстояться и жидкость сливают. Снова заливают водой и снова декантируют. Так повторяют 7–10 раз, после чего биогель заливают 300 мл буферного раствора рН 7,7 и оставляют для набухания на 24 ч, затем заполняют колонку.

На готовую колонку наносят ферментный раствор 1–2 мл, содержащий 50–100 мг белка.

Колонку присоединяют к резервуару с буферным раствором и начинают элюцию. Скорость вытекания раствора с колонки 3 мл за 1 ч. Собирают отдельные фракции объемом 3 мл с помощью коллектора для сбора фракций и анализируют на содержание белка и активность фермента.

Активность фермента определяют спектрофотометрическим методом. Результаты представляют графически, так на оси ординат откладывают активность фермента и содержание белка, на оси абсцисс – номера фракции.

Наряду с *o*-дифенолоксидазной активностью определяют и моно-фенолоксидазную активность.

Каждая из полученных фракций *o*-дифенолоксидазы может затем подвергаться электрофоретическому разделению с целью исследования изоэнзимного состава каждой фракции.

Аналогично выделяют фракции пероксидазы, используя для этого биогель Р-60 или сефадекс G-75. Во фракциях определяют параллельно содержание белка и активность фермента спектрофотометрически или по методу Бояркина.

### 5.3.2 Пероксидаза

Пероксидаза (донор: перекись водорода-оксидоредуктаза, 1.11.1.7) является гемопроteidом.

В настоящее время известно, что пероксидаза обладает двумя функциями: собственно пероксидазной и оксидазной.

Выполняя пероксидазную функцию, этот фермент катализирует реакцию окисления различных субстратов определенной химической

природы, перекись выполняет роль акцептирующего электроны окислителя. К субстратам, окисляемым пероксидазой в присутствии перекиси, могут быть отнесены следующие соединения:

- практически все фенолы (пирокатехин, пирогаллол, галловая кислота, гваякол и др.);
- ароматические амины (аланин, бензидин, парафенилендиамин, билирубин и др.);

- иодистый водород;
- легкоокисляемые вещества типа аскорбиновой кислоты, нитритов и др.

## Работа 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗНОЙ ФУНКЦИИ

**Метод Бояркина** Метод основан на измерении времени, за которое опытный раствор достигает определенной оптической плотности.

В качестве субстрата используется бензидин, в результате окисления которого образуется соединение синего цвета.

Реактивы: ацетатный буферный раствор, рН 5,4; раствор бензидина на ацетатном буфере; 0,03%-ная  $H_2O_2$ .

Приготовление бензидина: в мерную колбу емкостью 200 мл, наполненную на 2/3 дистиллированной водой, прибавляют 2,3 мл (2,4 г) ледяной уксусной кислоты и 184 мг бензидина. Колбу подогревают примерно до 50–60° С на водяной бане при постоянном взбалтывании. После полного растворения бензидина (10–15 мин) в колбу добавляют 5,45 г уксуснокислого натрия, после его растворения колбу охлаждают и доливают водой до метки. При хранении в темном месте раствор сохраняется 7–10 дней.

Ход определения. Навеска растительного материала (50–100 мг) растирается в ступке с водой (или с ацетатным буферным раствором рН 5,4). Затем переносится в мерную колбочку на 25 мл и доводится до метки. Каждая вытяжка настаивается 5–10 мин и центрифугируется в течение 10 мин при 3000 об/мин. Измерение активности проводят в той же последовательности, что и при приготовлении вытяжек.

Об активности пероксидазы судят по времени образования синей окраски окисленного бензидина. Для измерения активности лучше брать такие разведения вытяжки, чтобы изменение окраски происходило бы за 10–40 сек.

Непосредственно для определения в две кюветы толщиной в 2 см наливают по 2 мл вытяжки, 2 мл буферного раствора, 2 мл раствора бензидина.

Ставят кюветы в кюветодержатели прибора, одну слева (контроль), другую справа (опыт). В левую контрольную кювету наливают 2 мл воды, в правую опытную кювету доливают 2 мл 0,03%-ной  $H_2O_2$  пипеткой с широким носиком. При этом сильная струя перемешивает содержимое кюветы. Одновременно с первой каплей включают секундомер. В опытной кювете раствор синееет, отмечают время от начала приливания  $H_2O_2$  до достижения раствором заданной оптической плотности (0,250). Проводят три определения и берут среднее значение.

Активность фермента рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{D(\alpha \cdot \beta \cdot \gamma)}{td}$$

где  $D$  — оптическая плотность равна 0,250;  $d$  — толщина слоя жидкости в см (толщина кюветы);  $t$  — время в сек;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  — факторы разведения;  $\alpha$  — отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки в мл к весу навески в г;  $\beta$  — степень дополнительного разведения вытяжки (если это потребуется);  $\gamma$  — степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси (при данных условиях — 4).

Таким образом результаты отражают изменение оптической плотности за 1 сек на 1 г сырого веса ткани.

### **Определение пероксидазы на ФЭКе с гваяколом и пирогаллолом**

Реактивы: гваякол — 183 мг на 25 мл  $H_2O$  или пирогаллол — 189 мг на 25 мл  $H_2O$  (раствор готовится в день определения); фосфатный буферный раствор 1/15 M, pH 6,7;  $H_2O_2$  0,15%-ный раствор.

Для приготовления ферментной вытяжки навеска ткани 100 мг растирается в ступке с фосфатным буферным раствором, переносится в мерную колбу на 25 мл и доводится буферным раствором до метки. После 10–15 мин раствор центрифугируется при 3000–4000 об/мин в течение 10 мин. Осадок отбрасывается.

Ход определения. В две кюветы толщиной 2 см наливают 3,5 мл  $H_2O$ , 2 мл буферного раствора, 0,5 мл ферментной вытяжки, 1 мл субстрата. Далее поступают так, как описано выше в предыдущей работе.

### **Спектрофотометрическое определение пероксидазной активности**

Приготовление реактивов и ферментной вытяжки проводится так же, как описано в предыдущем определении.

Ход определения. При определении с гваяколом используют свет с длиной волны 470 нм, с пирогаллолом — 430 нм (максимумы поглощения продуктов реакции — тетроговаякола и пурпургаллина соответственно).

В опытную кювету толщиной 1 см помещают: 0,5 мл субстрата, 0,8 мл буферного раствора, 0,12 мл ферментной вытяжки, 1,1 мл  $H_2O$ , 0,5 мл  $H_2O_2$ .

В контрольную кювету, по которой устанавливается спектрофотометр, вместо перекиси водорода помещают такое же количество воды.

В опытную кювету, где находятся все компоненты реакции, за исключением  $H_2O_2$  наливают 0,5 мл раствора  $H_2O_2$ ; одновременно с первой каплей включают секундомер. Добавление  $H_2O_2$  служит стартом реакции. Кювета закрывается крышкой, взбалтывается и ставится в кюветодержатель на пути света. Крышка кюветного отделения закрывается. При открытой шторке

через 20 сек проводят отсчет, подводя стрелку миллиамперметра в нулевое положение ручкой потенциометра отсчета. Отсчеты снимают через каждые 20 сек три раза

Результаты выражают в количестве образовавшегося пурпургаллина или тетрагваякола, для чего используются следующие коэффициенты расчета:

для пурпургаллина  $E_{430} = 2.47 \text{ см}^{-1} \text{ ммк}^{-1}$ ;

для тетрагваякола  $E_{470} = 26.6 \text{ см}^{-1} \text{ ммк}^{-1}$ .

#### Работа 6. ОКСИДАЗНАЯ ФУНКЦИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ

Наряду с каталитическим действием, осуществляемым за счет кислорода перекиси, пероксидаза способна функционировать как оксидаза, катализируя окисление субстрата за счет молекулярного кислорода в отсутствие перекиси водорода. В настоящее время большинство исследователей считают оксидазную функцию пероксидазы наиболее важной в процессах нормального дыхания растений.

Одно из основных отличий каталитического действия пероксидазы в ее оксидазной функции состоит в том, что железо, входящее в состав активного центра пероксидазы, в процессе катализа изменяет свою валентность. Следовательно, один и тот же фермент обладает двумя разными функциями — пероксидазной и оксидазной. Это было подтверждено и на кристаллических препаратах пероксидазы. В качестве субстратов в оксидазной функции, т. е. с помощью молекулярного кислорода, пероксидаза может окислять следующие соединения: флороглюцин, диоксифумаровую кислоту, восстановленный НАД, НАДФ, индолилуксусную кислоту, индолилпропионат, индолилбутират, оксалат, кетомалонат, фенилпириват.

#### Манометрическое определение флороглюцинооксидазной активности пероксидазы

Метод определения флороглюцинооксидазной активности пероксидазы основан на измерении поглощения кислорода гомогенатом растительной ткани (или митохондриями и хлоропластами) при наличии субстрата фермента флороглюцина и соответствующих кофакторов (ионы  $\text{Mn}^{2+}$ ).

Приготовление растительной вытяжки. Для приготовления растительной вытяжки 3–5–10 г листьев (без средней жилки) растирают с 10–30 мл среды, содержащей 0,066 М фосфатный буфер pH 7,8.

Гомогенат отжимают через полотно или фильтруют через обычный бумажный фильтр.

Опыты проводят в аппарате Варбурга при температуре  $+25^\circ \text{C}$ . В основной сосуд наливают 2 мл растительной вытяжки, в боковой отросток — 1 мл раствора флороглюцина (0,01–0,02 М), усредненного  $\text{K}_2\text{CO}_3$  до pH 7,8 (опытный вариант) или 1 мл  $\text{H}_2\text{O}$  (pH 7,8 доведена на потенциометре  $\text{K}_2\text{CO}_3$

–контрольный вариант).

В центральный сосудик, в который предварительно вставлен кусочек фильтровальной бумаги для увеличения КОН-поверхности, наливают 0,3 мл 20% КОН. Термостатирование проводят в течение 10 мин. Время опыта 1 ч. Отсчет в аппарате Варбурга проводят через каждые 20–30 мин.

Активность фермента выражают в микромолях поглощенного кислорода на 0,1–1 мг белка за 1 ч.

### 5.3.3 Каталаза

Каталаза является железопорфириновым ферментом. Она катализирует реакцию, в которой 1 молекула перекиси водорода является донором, а другая — акцептором электронов.

Донорами водорода могут служить и некоторые органические соединения, в частности этиловый спирт.

Фермент каталаза широко распространен в растительных тканях и является одним из наиболее активных ферментов. Активность каталазы можно определить манометрическим методом.

Реактивы: фосфатный буферный раствор 1/15 М, рН 6,8; 0,04 М раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 20%-ный раствор КОН.

Приготовление ферментной вытяжки.

Навеска ткани 50–200 мг растирается с буферным раствором, переносится в мерную колбу на 25 мл и доводится буферным раствором до метки.

Ход определения

В основной объем манометрического сосудика помещают 2 мл ферментной вытяжки, а в боковой отросток 1 мл раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В контрольные сосудики вместо перекиси водорода помещают 1 мл  $\text{H}_2\text{O}$ . В центральный стаканчик помещают 0,3 мл 20%-ного раствора КОН.

После уравнивания температуры переливают содержимое боковых отростков к ферментной вытяжке и отмечают время. В зависимости от активности фермента отсчет проводят через 3–5–10 мин два–три раза. Определение не следует проводить при высокой температуре.

Активность фермента выражают в микролитрах выделившегося кислорода в минуту на 1 г сырого веса ткани, или 1 мг белка.

Газометрическое определение скорости выделения кислорода при действии каталазы на  $\text{H}_2\text{O}_2$ , вследствие очень высокой активности фермента, можно более грубо проводить в специальных очень просто устроенных каталазниках.

### 5.3.4 Аскорбиноксидаза

Аскорбиноксидаза катализирует прямое окисление аскорбиновой кислоты, которая, легко отдавая два иона водорода, превращается в дегидроформу. Являясь переносчиком водорода, аскорбиновая кислота тесно связана со всей системой ферментов, участвующих в дыхательном метаболизме растительной клетки.

Аскорбиноксидаза может быть определена двумя методами: манометрическим и спектрофотометрическим.

**Спектрофотометрическое определение** Определение производится на спектрофотометре в ультрафиолетовой области спектра (следовательно, с кварцевыми кюветами). Для анализа берут две весовые повторности (0,2–1 г в зависимости от объекта). В случае, если расчет необходимо сделать на площадь, а не на вес, как обычно, то вырезаются диски из листьев с помощью сверла определенного диаметра. В этом случае в анализ берется 5–15–20 дисков (диаметром 12–18 мм).

Каждая проба растирается в фарфоровой ступке на холоду (в холодной камере при температуре 0–4°C), переносится количественно в мерную колбу на 25 мл и доводится до метки. Растирание навески и доведение до метки проводится с помощью фосфатного буфера pH 7,4.

После доведения до метки колба хорошо взбалтывается и вся вытяжка переносится в воронку с обычным фильтром. Фильтрация проводится на холоду в течение 5–10 мин. Фильтрат немедленно фотометрируется, так как активность фермента падает при стоянии проб даже на холоду.

Для определения активности фермента в кюветы приливается:

Контроль

0,005 M HCl	0,1 мл
0,005 M MgSO <sub>4</sub>	0,1 мл
фосфатный буфер pH 6,2	1,0 мл
фильтрат	1,0 мл
дистиллированная вода	0,8 мл

Опыт

0,005 M HCl	0,1 мл
0,005 M MgSO <sub>4</sub>	0,1 мл
1/15 M фосфатный буфер pH 6,2	1,0 мл
фильтрат	1,0 мл

аскорбиновая кислота  $1,2 \cdot 10^{-4}$  М 0,8 мл

Момент приливания раствора аскорбиновой кислоты отмечается по секундомеру. Первый отсчет снимается через 30 сек, затем через 1 мин в течение 10 мин. Фотометрирование проводится при длине волны 279 нм.

Падение оптической плотности линейно во времени. Результаты выражают в единицах падения оптической плотности за 10 мин на единицу веса или площади листа (или на единицу белка) по формуле

$$A = \frac{\Delta D \cdot d \cdot V_1 \cdot n_1}{n \cdot V},$$

где  $\Delta D$  — величина падения оптической плотности;  $n$  — количество дисков в пробе;  $d$  — разведение в колбе;  $V$  — объем фильтрата в кювете;  $A$  — активность фермента;  $V_1$  — общий объем жидкости в кювете;  $n_1$  — количество дисков.

**Манометрический метод** Реактивы: 1,5%-ный раствор аскорбиновой кислоты (раствор готовится перед употреблением), фосфатный буферный раствор 1/15 М, рН 7,4, 20%-ный раствор КОН.

Ход работы

Подготавливают к работе аппарат Варбурга.

В основной объем сосудика помещают 200–300 мг срезов изучаемой ткани и 2 мл буферного раствора рН 7,4. В боковые отростки опытных сосудиков вносят 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, а в контрольные сосудики вместо аскорбиновой кислоты наливают воду.

Необходимо также ставить, как это описано для полифенолоксидазы, два сосудика термобарометра с 2 мл буферного раствора и 1 мл аскорбиновой кислоты в отростке и два сосудика с буферным раствором и водой в отростке.

Это даст возможность сделать поправку не только на колебания температуры и давления, но и на самоокисление аскорбиновой кислоты.

Метод определения и выражения активности фермента тот же, что и для полифенолоксидазы.

### 5.3.5 Полифенолоксидазы

Полифенолоксидаза (о-дифенол: кислород-оксидоредуктаза: 1.10, 3.1), медь-содержащий фермент, катализирует окисление орто-дифенолов в присутствии кислорода с образованием воды и орто-хинонов. Ферментная система окисляет также монофенолы. В основе действия фермента лежит, по-видимому, обратимое окисление атома меди.

Механизм действия фермента основан на возможности образования комплексов меди фермента с кислородом.

**Определение активности *o*-дифенолоксидазы по Бояркину** Принцип метода тот же, что и для пероксидазы по Бояркину.

Реактивы: 1%-ный раствор пирокатехина. Готовится перед определением; 0,01–0,02%-ный раствор парафенилендиамина, готовится на 0,01 н. щавелевой кислоте. Можно вместо парафенилендиамина использовать диметилпарафенилендиамин, но его растворяют в воде.

Ход определения

Навеска растительного материала (500–1000 мг) растирается в фосфатном буферном растворе (рН 7,0–7,4) переносится в мерную колбу на 25 мл и доводится до метки и центрифугируется.

Техника определения на ФЭКе та же, что и определения активности пероксидазы.

В две кюветы толщиной 2 см вносится: 2 мл вытяжки, 2 мл воды или буферного раствора, 2 мл раствора парафенилендиамина.

Обе кюветы ставятся в ФЭК. Уравниваются световые потоки. Стрелка гальванометра стоит на нуле. Определение проводят при желто-зеленом светофильтре.

В левую контрольную кювету вносят 2 мл воды, в правую опытную кювету — 2 мл раствора пирокатехина. Отмечают по секундомеру время от начала приливания пирокатехина до момента, когда оптическая плотность достигнет положения 0,250.

Активность фермента рассчитывают по той же формуле, что и активность пероксидазы.

**Спектрофотометрический метод** Реактивы: 0,05 М раствор пирокатехина. (Могут быть использованы различные субстраты. Определения ведутся при длине волны, свойственной для используемого субстрата), фосфатный буферный раствор 1/15 М, рН 7,4, ферментная вытяжка.

При работе с белковыми препаратами фермента готовят раствор с концентрацией белка 20–50 мг/мл.

Определения с пирокатехином проводят при длине волны 420 нм. В кювету спектрофотометра толщиной 1 см помещают: 0,5 мл ферментного препарата, 2,0 мл фосфатного буферного раствора рН 7,4, 0,5 мл раствора пирокатехина.

Раствор пирокатехина приливается последним. С первой каплей включается секундомер. Измерение проводят в течение минуты с интервалом в 20 сек. В контрольной кювете пирокатехин заменен  $H_2O$ .

Результаты выражают или в изменении оптической плотности за 1 мин на 1 г сырого веса или 1 мг белка, или в количестве окисленного субстрата за 1 мин на 1 мг белка.

При работе с другими субстратами определения проводят при соответствующих для них длинах волн.

Области максимального поглощения для различных субстратов:

	$\alpha$ в нм
Пирокатехин	366–420
ДОФА (диоксифенилаланин)	436–475
Хлорогеновая кислота	328–400

### 5.3.6 Дегидрогеназы

Дегидрогеназы, как говорит само название, — ферменты, катализирующие дегидрирование дыхательного субстрата. Активированный ими водород переносится затем на другой фермент — переносчик водорода — с более высоким окислительно-восстановительным потенциалом.

По своим функциям обширная группа дегидрогеназ делится на анаэробные и аэробные дегидрогеназы.

К аэробным дегидрогеназам относится ряд флавопротеиновых ферментов, катализирующих перенос водорода непосредственно на кислород.

Акцептором водорода для анаэробных дегидрогеназ является промежуточный переносчик водорода. К этой группе относятся пиридиновые и ряд флавопротеиновых ферментов.

Все дегидрогеназы — двухкомпонентные ферменты. Большая специфичность ферментов к субстрату определяется белковой частью ферментов.

По природе простетических групп дегидрогеназы делятся на пиридиновые и флавопротеиновые (или аллоксазиновые) ферменты.

Коферментами пиридиновых дегидрогеназ является никотинамидадениндинуклеотид (НАД) или никотинамидадениндинуклеотид фосфат (НАДФ). В основе их действия лежат окислительно-восстановительные превращения никотинамида, входящего в состав кофермента:

К пиридиновым дегидрогеназам относятся, например, малатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа, дегидрогеназа фосфоглицеринового альдегида и др.

Простетической группой флавопротеиновых дегидрогеназ являются производные рибофлавина; к ним относятся флавинадениндинуклеотид (ФАД) и

флавиномононуклеотид (ФМН). Сукцинатдегидрогеназа и НАД · Н<sub>2</sub>-дегидрогеназа, например, содержат ФАД.

Среди флавиновых ферментов большое значение имеют аэробные дегидрогеназы или оксидазы. К ним относятся, например, глюкооксидаза, ксантиноксидаза, оксидазы аминокислот, гликолатоксидаза и другие ферменты.

Для определения активности дегидрогеназ могут быть использованы разнообразные методы, как полярографический, манометрический, спектр офтометрический, метод Тунберга и др.

**Метод Тунберга** Одним из наиболее простых и старых методов определения активности дегидрогеназ является метод Тунберга.

Для этого метода используют некоторые краски, акцептирующие водород дегидрогеназ (метиленовая синь, 2,6-дихлорфенолиндофенол, тионин). При окислительно-восстановительных превращениях этих красок цвет раствора меняется. Восстановленная форма перечисленных красок — бесцветна (лейкоформа), но так как краски легко окисляются на воздухе, необходимо определение проводить в отсутствие кислорода. Это условие достигается при проведении определения в специальных пробирках Тунберга.

Пробирка Тунберга имеет шлиф с отводной трубкой, в пробирку вставляется пробка с боковым шарикообразным расширением. В шлифе пробки имеется отверстие. Шлифы смазываются вакуумной смазкой. Сопоставив отверстие в шлифе пробки с отводной трубкой и присоединив отводную трубку к масляному электрическому насосу, из пробирки можно удалить воздух. Закрывают пробирку поворотом пробки на 180°.

Реактивы: краска, 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия —  $2,5-5 \cdot 10^{-4}$  М, метиленовая синь —  $10^{-4}$  М, тионин —  $10^{-3}$  М, как буферный раствор может быть использован 0,87%-ный раствор К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>, фосфатный буфер, трис-буфер рН 7,4–8,2 (оптимум рН для разных дегидрогеназ может колебаться в этих пределах), раствор субстрата 0,02–0,05 М, раствор соответствующей кислоты перед употреблением должен быть нейтрализован бикарбонатом натрия (сухим).

Определение проводят на взвеси срезов или гомогенате ткани.

Концентрация: 200–400 мг ткани на 2 мл буферного раствора.

При работе с белковыми препаратами обязательно вносить соответствующие коферменты (НАД, НАДФ). Их концентрация в общем объеме реагирующей смеси обычно  $5 \cdot 10^{-5}$  М.

Ход работы

Готовят срезы тканей или гомогенат. В тщательно вымытые пробирки помещают 2–3 мл гомогената тканей или 200–400 мг срезов ткани и 2–3 мл

буферного раствора, затем 1 мл раствора субстрата. Параллельно ставят пробирки, куда вместо субстрата добавляют 1 мл воды.

В головки наливают 1 мл краски. Определения проводят в трехкратной повторности.

Шлифы головки смазываются вакуумной смазкой (можно использовать смазку для манометрических исследований) и притирают головку к пробирке, вращая её на небольшое количество градусов. Отверстие головки должно совпадать с отверстием отводной трубки. Трубку присоединяют к насосу и откачивают воздух в течение 2–3 мин. Затем головку трубки поворачивают на 180°, снова притирают шлифы и только тогда отсоединяют трубку от насоса.

При откачивании трубку надо держать наклонно, слегка встряхивая содержимое, тогда воздух будет выходить без сильных толчков. Следует следить, чтобы во время этой процедуры краска из головки не попала в пробирку.

После эвакуации воздуха пробирку помещают на 10–15 мин в термостатную ванну с температурой 37° С, после чего краску из головки переливают к содержимому пробирки и отмечают время. Определяют время обесцвечивания краски на 90%. Для этого сравнивают цвет пробирки с контрольными пробирками в головки которых помещают 1 мл разбавленной в 10 раз краски; в пробирки помещают прокипяченный в течение 3 мин гомогенат (или срезы) и 1 мл H<sub>2</sub>O.

В пробирках без субстрата определяется общая дегидрогеназная активность при использовании эндогенного субстрата.

Расчет активности дегидрогеназы проводится по разнице времени обесцвечивания между вариантами с субстратом и без него.

Для выражения активности фермента в относительных единицах используют формулу:

$$A = \frac{1}{n} \cdot 100,$$

где А — активность фермента в относительных единицах; n — время обесцвечивания краски на 90% в минутах (не должно превышать 30 мин).

В конечном итоге активность рассчитывают на единицу сырого или сухого веса, на 100 мг белкового препарата или на 1 мг белка.

Наблюдение за обесцвечиванием можно проводить на спектрофотометре, для этого удобнее иметь пробирки с плоскими стенками.

Достоверность результатов, полученных методом Гунберга, зависит в некоторой степени от того, насколько тщательно из пробирки удален кислород и от качества шлифов, поэтому определение проводят в трехкратной повторности и тщательно следят за тем, как притерты шлифы. Хорошо притертые

шлифы прозрачны.

**Спектрофотометрический метод** Навеска растительного материала растирается на холоду в ступке с 1/15 М фосфатным буферным раствором рН 7,4–8,2. Гомогенат переносится в мерную колбу на 25 мл и доводится до метки тем же буферным раствором. Полученная вытяжка центрифугируется на холоду при 1200–1800 g в течение 15 мин. Осадок отбрасывается. Определение активности проводят в надосадочной жидкости.

В трубку Гунберга вносят 4 мл надосадочной жидкости, 1 мл коэнзима (НАД и НАДФ) и 0,5 мл субстрата; в отросток наливают 1 мл раствора тионина. Раствор коэнзима готовится на фосфатном буферном растворе из расчета 1 мкМ на 1 мм. Определения можно вести не только с тионином, но и с другими красками.

Эвакуация воздуха проводится в течение 3–5 мин. После эвакуации воздуха трубки термостатируются при температуре +37° С в течение 15 мин в термостатной ванне, после чего содержимое из отростка выливается в основную часть пробирки и раствор фотометрируется при длине волны 605 нм. В качестве контроля можно использовать трубку с буферным раствором. Для фотометрирования трубок Гунберга применяются специальные кюветодержатели. Последующие измерения оптической плотности проводят каждые 5 мин в течение 20–30 мин, иногда до 40 мин. Это зависит от активности фермента. В промежутках между измерениями трубки находятся в термостатной ванне.

Активность фермента рассчитывается по формуле:

$$A = \frac{(D_1 - D_2) \cdot 50}{t},$$

где  $D_1$  — исходная оптическая плотность раствора;  $D_2$  — конечная оптическая плотность;  $t$  — время в минутах.

Обычно результаты выражаются в изменении оптической плотности за 10 мин.

# Литература

1. Баславская Е.С. Практикум по физиологии растений /Е.С. Баславская, О.М. Трубецкова. – М.: Московский университет, 1964. – 328 с.
2. Гавриленко В.Ф. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез, дыхание: учебное пособие / В.Ф. Гавриленко, М.Е. Ладыгина, Л.М. Хандобина. – М.: Высш. шк., 1975, – 392 с.
3. Колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2: Техническое описание и инструкция по эксплуатации. – Загорск: ЗОМЗ, 1990. – 36 с.
4. Методы практической биохимии / Б. Уильямс, К. Уилсон. Перевод с англ. под ред. С.Е. Северина, А.Д. Виноградова. – М.: Мир, 1978. – 268 с.
5. Спектрофотометр СФ-26: Техническое описание и инструкция по эксплуатации. – Л.: ЛОМО им. В.И.Ленина, 1979. – 34 с.
6. Третьяков Н.Н. Практикум по физиологии растений /Н.Н. Третьяков, Т.В. Карнаухов, Л.А. Паничкин [и др.]; под общей ред. Н.Н. Третьякова. – М.: Агропромиздат., 1990 – 271 с.

# Оглавление

<b>Введение</b>	<b>2</b>
<b>1 Методические указания по технике безопасности</b>	<b>3</b>
1.1 Основные правила работы в лаборатории . . . . .	3
1.2 Первая медицинская помощь . . . . .	4
<b>2 Статистическая обработка результатов опытов</b>	<b>6</b>
<b>3 Водный режим и минеральное питание</b>	<b>8</b>
3.1 Вегетационный метод исследований . . . . .	9
3.2 Изучение поглощающей деятельности корневой системы . . . . .	14
3.2.1 Возможные варианты опыта . . . . .	17
3.3 Изучение влияния условий минерального питания на рост и развитие растений . . . . .	19
3.3.1 Количественный учет роста растений . . . . .	21
3.4 Влияние внешних условий на водный режим растений . . . . .	22
3.5 Лабораторные работы по теме «Водный режим и минеральное питание растений» . . . . .	22
<b>4 Фотосинтез</b>	<b>39</b>
4.1 Характеристика пигментных систем фотосинтетического аппарата . . . . .	39
4.2 Спектрофотометрические методы исследования пигментов . . . . .	51
4.3 Хроматографические методы исследования пигментов . . . . .	59
<b>5 Дыхание</b>	<b>74</b>
5.1 Подготовка растительного материала для изучения окислительных процессов . . . . .	74
5.1.1 Метод вакуум-инfiltrации . . . . .	75
5.1.2 Выделение функционально активных структурных компонентов клетки . . . . .	76

5.2	Манометрический метод определения интенсивности дыхания . . .	84
5.3	Ферментные системы дыхания . . . . .	87
5.3.1	Приготовление белковых препаратов . . . . .	88
5.3.2	Пероксидаза . . . . .	90
5.3.3	Каталаза . . . . .	94
5.3.4	Аскорбиноксидаза . . . . .	95
5.3.5	Полифенолоксидазы . . . . .	96
5.3.6	Дегидрогеназы . . . . .	98

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО