

ROZDZIAŁ I. **SKŁAD CHEMICZNY ROŚLIN**
WYKRYWANIE SKŁADNIKÓW
MINERALNYCH W ROŚLINACH

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Tkanki roślinne składają się z wody, związków organicznych oraz związków nieorganicznych. Zawartość wody w roślinach stanowi średnio 70–95% ogólnej ich masy i może różnić się znacznie w zależności od gatunku, wieku rośliny, organu, pory roku oraz aktualnie panujących warunków środowiska. Największą zawartością wody charakteryzują się tkanki, w których intensywność procesów metabolicznych jest najwyższa. Średnia zawartość wody wyrażona w procentach całkowitej masy rośliny jest najwyższa w płatkach kwiatów (90–95%), w liściach wynosi około 60–95%, a najmniej zasobne w wodę są nasiona i ziarniaki zbóż (5–15%). Naturalnie uwodniona, zważona bezpośrednio po pobraniu masa rośliny lub jej części to **świeża masa roślinna (ś. m.)**.

Z uwagi na dynamikę zmian zawartości wody w tkankach roślinnych, aby przeprowadzić analizę składu chemicznego pobranego materiału, pozyskuje się suchą masę roślinną. **Sucha masa roślinna (s. m.)** jest masą tkanki roślinnej otrzymaną w procesie ogrzewania próbki w temperaturze 105°C przez dwie godziny, a następnie w 80°C – aż do uzyskania stałej masy. Podczas ogrzewania lotne związki zawarte w tkance uchodzą do atmosfery, a substancje wrażliwe na działanie wysokiej temperatury zostają rozłożone do związków prostych. Sucha masa roślinna jest pozostałością zawierającą związki organiczne i nieorganiczne oraz wodę związaną chemicznie. Prawie połowę suchej masy roślinnej stanowi węgiel (ok. 45%), podobnie tlen (ok. 42%), około 6,5% – wodór, a 1,5% – azot. W celu dalszej analizy składu mineralnego tkanek suchą masę poddaje się procesowi spiekania prowadzonemu w temperaturze 600°C. Spaleniu ulega materiał organiczny, a powstające w tym procesie CO_2 , H_2O , NH_3 i H_2S ulatniają się do atmosfery. Pozostała część związków nielotnych otrzymana po prażeniu to **popiół roślinny**, który zawiera

pierwiastki pobrane z podłoża, z wyjątkiem azotu oraz częściowo siarki, i stanowi 0,2–20% suchej masy. W skład popiołu wchodzi głównie tlenki takich pierwiastków, jak: K, Mg, Na, Fe, P, S, Si, a także sole: chlorki, siarczki i fosforany.

Kryteria podziału pierwiastków występujących w organizmach roślinnych:

1. Kryterium jakościowe – dzieli pierwiastki na podstawie niezbędności pobieranych ze środowiska jonów oraz ich sposób działania:

a) pierwiastki niezbędne – są konieczne do przejścia całego cyklu rozwojowego rośliny, od kiełkowania do wydania żywotnych nasion, i nie mogą być zastąpione innymi pierwiastkami (N, K, Ca, Mg, P, S oraz Cl, Fe, Cu, B, Zn, Mn, Mo, Ni);

b) pierwiastki korzystne (pożądane) – wpływają pozytywnie na wzrost i rozwój roślin, ale nie są niezbędne w przebiegu ontogenezy (Na, Si, Co, Al, V);

c) pierwiastki zbędne (balastowe) – jeśli występują w podłożu, mogą być pobierane przez roślinę, jednak nie pełnią żadnych funkcji fizjologicznych lub mogą wykazywać działanie toksyczne (np. Pb, Cd, Hg).

2. Kryterium ilościowe – dotyczy ilości, w jakiej są pobierane pierwiastki z podłoża oraz ich zawartości w suchej masie roślin:

a) makroelementy – występują w roślinach na ogół w ilości powyżej 0,1% (1000 ppm) suchej masy. Są to: N, K, Ca, Mg, P, S;

b) mikroelementy – występują w roślinach w ilości około 1000-krotnie mniejszej niż makroelementy (0,01–0,00001%; 100–0,1 ppm). Są to: Cl, Fe, Cu, B, Zn, Mn, Mo, Ni.

3. Kryterium właściwości chemicznych oraz fizjologiczno-biochemicznych:

a) pierwiastki organogenne: C, H, O; roślina pobiera je w postaci CO_2 , H_2O i O_2 ;

b) niemetale: N, S, P, B, Cl;

c) metale alkaliczne i ziem alkalicznych: K, Ca, Mg, Na oraz półmetal Si;

d) metale ciężkie: Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, Ni, Co, Al, V.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Doświadczenie I

Mikroanaliza popiołu roślinnego

Cel ćwiczenia

Wykrycie obecności chloru, fosforu, magnezu, potasu, siarki, wapnia i żelaza w popiele roślinnym.

Zasada metody

Składniki mineralne popiołu roślinnego wykrywa się za pomocą charakterystycznych reakcji chemicznych, w wyniku których poszczególne jony tworzą łatwo krystalizujące lub barwne związki.

Materiał

popiół roślinny, np. z liści tytoniu lub z drewna

Odczynniki

10% HCl, 10% HNO₃, 1% AgNO₃, 1% (NH₄)₂MoO₄, 1% HNO₃, 10–25% NH_{3(aq)}, 1% Na₂HPO₄, 70% HClO₄, 96% C₂H₅OH, 5% BaCl₂, nasycony roztwór (NH₄)₂C₂O₄, 1% H₂SO₄, 2% heksacyjanożelazian (II) potasu – K₄[Fe(CN)₆]

Sprzęt laboratoryjny

waga analityczna, mikroskop świetlny, 2 probówki chemiczne, 7 szkiełek podstawowych, szkiełka nakrywkowe, płytka pH-metryczna, bagietki szklane

I.A. PRZYGOTOWANIE DWÓCH RODZAJÓW WYCIĄGÓW Z POPIOŁU

Na wadze odważyć dwie porcje po 50 mg popiołu roślinnego otrzymanego z liści tytoniu lub z drewna. Każdą z porcji przenieść do osobnych, podpisanych probówek i zalać 2 cm³:

a) 10% HCl,

b) 10% HNO₃.

Zawartość probówek ostrożnie wymieszać i pozostawić na 5 minut, aby osad opadł na dno. Do wykrywania składników mineralnych w popiele używać płynu znad osadu, bez uprzedniego sączenia przez bibułę. W celu wykrycia składników mineralnych wszystkie reakcje chemiczne przeprowadzać na szkiełkach podstawowych, bez używania szkiełek nakrywkowych.

Przeprowadzając poniższe doświadczenia, zawsze należy: (1) podpisać szkiełko podstawowe, (2) nałożyć za pomocą bagietki szklanej kroplę analizowanego wyciągu, (3) w odległości około 1 cm od kropli wyciągu nałożyć kroplę odczynnika, (4) za pomocą bagietki szklanej połączyć obie krople wąskim kanalikiem. Po upływie 2–5 minut (w zależności od rodzaju reakcji) w analizowanych preparatach obserwować pod mikroskopem (powiększenie obiektywu 10× lub 20×) charakterystyczne kryształy, które zazwyczaj najszybciej będą widoczne na brzegach kropli. Po dokonaniu obserwacji:

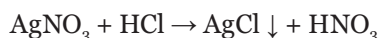
- 1) zapisać zasadę oznaczenia wraz z równaniem zachodzącej reakcji;
- 2) narysować kryształy wykrytych związków chemicznych, uwzględniając ich kształt, wielkość oraz barwę;
- 3) zapisać wnioski dotyczące obecności pierwiastków w analizowanym popiele.

UWAGA: Przy wykonywaniu reakcji na szkiełkach podstawowych zachować szczególną ostrożność, gdyż niektóre odczynniki są silnie żrące lub mają intensywną woń.

I.B. WYKRYWANIE PIERWIASTKÓW W POPIELE ROŚLINNYM

1. Wykrywanie chloru

Obok kropli wyciągu z popiołu w 10% HNO_3 umieścić kroplę 1% AgNO_3 . W miejscu połączenia płynów powstaje biały osad AgCl .



2. Wykrywanie fosforu

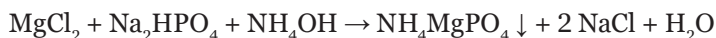
Obok kropli wyciągu z popiołu w 10% HNO_3 umieścić kroplę 1% molibdenianu (VI) amonu w 1% HNO_3 . W miejscu

połączenia kropli wytrącają się żółte kryształy fosfomolibdenianu amonu.



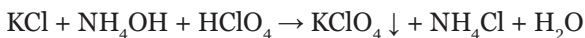
3. Wykrywanie magnezu

Kroplę wyciągu z popiołu w 10% HCl zobojętnić amoniakiem (1–2 krople), dodać kroplę 1% roztworu Na_2HPO_4 . Wytrącają się drobne kryształy fosforanu amonowo-magnezowego.



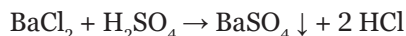
4. Wykrywanie potasu

Kroplę wyciągu z popiołu w 10% HCl zobojętnić amoniakiem (1–2 krople), dodać 2–3 krople kwasu chlorowego (VII). Wytrąca się biały osad nierozpuszczalny w 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.



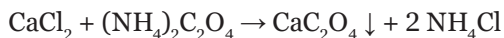
5. Wykrywanie siarki

Do wyciągu z popiołu w 10% HCl dodać kilka kropli 5% BaCl_2 . Wytrąca się biały, nierozpuszczalny osad BaSO_4 .

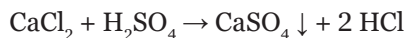


6. Wykrywanie wapnia

a) Wyciąg z popiołu w 10% HCl zobojętnić amoniakiem (1–2 krople), a następnie dodać kroplę nasyconego roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$. Wytrąca się biały osad szczawianu wapnia.

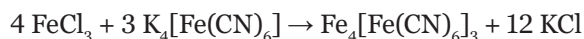


b) Do wyciągu z popiołu w 10% HCl dodać kroplę 1% H_2SO_4 . Powstaną kryształy siarczanu wapnia.



7. Wykrywanie żelaza

Do wyciągu z popiołu w 10% HCl dodać kroplę 2% heksacyjanożelazianu (II) potasu. Powstaje niebieskie zabarwienie – osad heksacyjanożelazianu (II) żelaza (III), czyli błękit pruski. Reakcję wykonać na płytce pH-metrycznej.

**Doświadczenie II**

Wykrywanie składników mineralnych w tkankach roślin
(reakcje histochemiczne)

Cel ćwiczenia

Wykrycie obecności magnezu, wapnia, szczawianu wapnia oraz rozpuszczalnych szczawianów ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$), azotanów (V) (NO_3^-), jonów amonowych (NH_4^+) i żelaza w tkankach roślin.

Zasada metody

Reakcje histochemiczne służą do wykrywania niewielkich ilości poszczególnych pierwiastków bezpośrednio w tkankach roślinnych. Są to reakcje mikrochemiczne, podczas których powstają barwne lub krystaliczne substancje. Wyniki reakcji histochemicznych obserwuje się najczęściej pod mikroskopem.

Materiał

siewki pomidora, ogonki liściowe pelargonii, łuska cebuli, łodyga begonii, korzeń marchwi, liście pszenicy, łodyga skrzypu

Odczynniki

1% wodorofosforan sodowo-amonowy ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$), 25% $\text{NH}_3(\text{aq})$, 2% H_2SO_4 , 5% $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ w 5% CH_3COOH , 8% NaHCO_3 , 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, nasycony roztwór NaOH w 90–96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 0,5% difenylamina [$(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NH}$] w 48% H_2SO_4 , 48% H_2SO_4 , 20% NaOH, odczynnik Nesslera [$\text{K}_2(\text{HgI}_4) + \text{KOH}$],

gorący C_2H_5OH , 2% $K_4[Fe(CN)_6]$, 2% HCl , 10% tiocyjanian potasu ($KSCN$), 10% HCl

Sprzęt laboratoryjny

zlewka 800 cm³, zlewka 50 cm³, kolba stożkowa 250 cm³, szkiełko zegarkowe o średnicy 7 cm, żyłетка, 2 skalpele, 2 pęsety, 10 szkiełek podstawowych, szkiełka nakrywkowe, mikroskop świetlny, 2 szalki Petriego, krystalizator na 50 cm³, bibuła filtracyjna, parownicza, waga analityczna, probówki chemiczne, bagietki szklane

1. Wykrywanie magnezu

W komórkach fotosyntetyzujących roślin magnez występuje głównie jako składnik chlorofilu. Spotyka się go również w formie mineralnej, szczególnie w nasionach i tkankach merystematycznych. Obecność magnezu mineralnego można łatwo wykazać przez wytrącenie go w formie kryształów fosforanu magnezowo-amonowego.

Na szkiełko podstawowe za pomocą bagietki szklanej nanieść kroplę 1% $NaNH_4HPO_4$, zanurzyć w niej wykonany żyłetką poprzeczny skrawek hipokotylu uzyskany z siewki pomidora. Całość umieścić w atmosferze nasyczonej parami amoniaku, np. pod szklanym kloszem (zlewka 800 cm³), pod którym uprzednio wstawiono szalkę Petriego lub krystalizator ze stężonym amoniakiem. Po 5–15 minutach wyjąć spod klosza szkiełko podstawowe z preparatem. Preparat przykryć szkiełkiem nakrywkowym i obejrzeć pod mikroskopem (powiększenie obiektu 10× lub 20×). W preparacie są widoczne kryształy fosforanu amonowo-magnezowego, które należy narysować w zeszycie.

2. Wykrywanie wapnia

W tkankach roślinnych wapń wchodzi w skład blaszki środkowej (protopektyny), występuje również w formie rozpuszczalnej w soku komórkowym. Przeważająca ilość wapnia, szczególnie w starszych organach, znajduje się w komórkach w formie kryształów: szczawianów, węglanów lub winianów wapnia.

Wykonać skrawki poprzeczne z łodygi i ogonka liściowego pelargonii. Narysować kryształki oglądane w doświadczeniach a, b i c.

- a) Poprzeczny skrawek łodygi lub ogonka liściowego pelargonii umieścić na szkiełku podstawowym w kropli 2% H_2SO_4 . Po upływie około 30 minut na brzegach wysychającej kropli pojawiają się kryształki siarczanu wapnia o kształcie igiełek.
 - b) Poprzeczny skrawek łodygi lub ogonka liściowego pelargonii umieścić na szkiełku podstawowym w kropli 5% $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ w 5% CH_3COOH . Preparat przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Po 30 minutach obejrzeć pod mikroskopem (powiększenie obiektywu 10× lub 20×) powstałe kryształki szczawianu wapnia.
 - c) Poprzeczny skrawek łodygi lub ogonka liściowego pelargonii umieścić na szkiełku podstawowym w kropli 8% NaHCO_3 i przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Tak przygotowany preparat włożyć na 10 minut do zamkniętej szalki Petriego, następnie wyciągnąć i obejrzeć pod mikroskopem (powiększenie obiektywu 10× lub 20×). Opisać, jakie rodzaje kryształów wytwarzają się w komórkach i wokół skrawka łodygi.
3. Wykrywanie kryształów szczawianu wapnia w łusce cebuli
W starszych komórkach roślinnych wapń występuje z reguły w formie kryształów szczawianu wapnia, które powstają w wyniku reakcji obecnego w komórkach kwasu szczawiowego z tym pierwiastkiem.

Mały skrawek suchej łuski cebuli włożyć na 24 godziny do 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, aby z martwych komórek usunąć powietrze, które przeszkadza przy oglądaniu preparatu pod mikroskopem. Następnie łuskę cebuli opłukać wodą, umieścić na szkiełku podstawowym w kropli wody destylowanej, przykryć szkiełkiem nakrywkowym i obejrzeć pod mikroskopem (powiększenie obiektywu 10× lub 20×). W komórkach można zaobserwować liczne, pryzmatyczne kryształki szczawianu wapnia. Nie zmieniając położenia preparatu, z jednej strony szkiełka nakrywkowego nanieść bagietką kroplę 2% H_2SO_4 , a z drugiej strony szkiełka nakrywkowego odciągać wodę za pomocą

paska bibuły filtracyjnej. W miejsce wody pod szkiełko wnika rozcieńczony H_2SO_4 . Obserwując w dalszym ciągu preparat pod mikroskopem, można zauważyć, że kryształy szczawianu wapnia ulegają rozpuszczeniu, a w różnych częściach preparatu tworzą się kryształy siarczanu wapnia o kształcie igiełek. W zeszycie narysować komórki łuski cebuli wraz z kryształami szczawianu wapnia i siarczanu wapnia.

4. Wykrywanie rozpuszczalnych szczawianów w łodydze begonii
W komórkach niektórych roślin szczawiany nie występują w formie kryształów, lecz w postaci rozpuszczalnej, może się też w nich gromadzić kwas szczawiowy.

Poprzeczny skrawek łodygi lub ogonka liściowego begonii umieścić na szkiełku podstawowym w kropli nasyconego roztworu NaOH w 90–96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym i obserwować pod mikroskopem (powiększenie obiektywu 10× lub 20×). W komórkach parenchymatycznych pojawiają się kryształy szczawianu sodu o kształcie igiełek. Kryształy układają się w formie gwiazd, snopków lub dendrytów.

5. Wykrywanie azotanów (V)

Reakcja z 0,5% $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NH}$ w 48% H_2SO_4 jest charakterystyczna dla azotanów (V). Można ją wykorzystywać tylko do takiego materiału roślinnego, który nie zawiera dużych ilości karotenu, gdyż ten w reakcji z H_2SO_4 zabarwia się na niebiesko, podobnie jak azotany (V) w reakcji z $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NH}$ w obecności H_2SO_4 .

- a) Na szkiełku podstawowym umieścić dwa poprzeczne skrawki łodygi pomidora. Na jeden skrawek nanieść kroplę 0,5% $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NH}$ w 48% H_2SO_4 , a na drugi – kroplę 48% H_2SO_4 . Skrawek traktowany roztworem difenyloaminy zabarwia się na niebiesko – jest to reakcja charakterystyczna dla jonów azotanowych (V). Obserwować również zmianę zabarwienia skrawka umieszczonego w 48% H_2SO_4 bez dodatku difenyloaminy i porównać zabarwienie obydwu skrawków.
- b) Na szkiełko podstawowe przenieść dwa poprzeczne skrawki korzenia marchwi. Postępować podobnie jak w punkcie a. Obydwa skrawki przybierają barwę

niebieską. Zinterpretować wyniki uzyskane w doświadczeniach a i b.

6. Wykrywanie jonów amonowych

Rozgniecioną świeżą tkankę liści pszenicy zalać 20% NaOH i zagotować w probówce. U wylotu probówki umieścić bibułę nasyoną odczynnikiem Nesslera: $K_2(HgI_4) + KOH$. W obecności jonów amonowych bibuła barwi się na żółto lub brunatno.

7. Wykrywanie żelaza

Z liści pszenicy wyekstrahować chlorofil gorącym C_2H_5OH . W tym celu drobno posiekane liście umieścić w kolbie stożkowej o objętości 250 cm^3 i zalać 100 cm^3 C_2H_5OH . Kolbę wstawić do gorącej łaźni wodnej (80°C) i ostrożnie mieszając, prowadzić ekstrakcję chlorofilu do etanolu, aż do całkowitego odbarwienia tkanki. Mały skrawek tkanki uzyskanej po ekstrakcji chlorofilu (ok. 2 cm^2) umieścić na szkiełku zegarkowym w 2% $K_4[Fe(CN)_6]$. Po 15 minutach dodać kroplę 2% HCl, po chwili przemyć skrawek wodą w zlewce o objętości 50 cm^3 . W obecności żelaza powstaje niebieskie zabarwienie. Jeśli zamiast 2% $K_4[Fe(CN)_6]$ zostanie użyty 10% KSCN, powstanie tiocyjanian żelaza (III) o czerwonym zabarwieniu.

8. Przygotowanie spodogramów

Ściany komórek niektórych roślin impregnowane są składnikami mineralnymi, głównie krzemianami. Spalając ostrożnie materiał roślinny, można otrzymać zarysy komórek zbudowane wyłącznie z tych elementów.

Do parowniczkę włożyć kawałek łodygi skrzypu, spalać do chwili pojawienia się białego szkieletu. Jedną część otrzymanego preparatu umieścić na szkiełku podstawowym w wodzie destylowanej, drugą – w 10% HCl, w którym wszystkie składniki mineralne, nie krzemowe, ulegają rozkładowi. Dokonać obserwacji mikroskopowej, narysować obraz spod mikroskopu (powiększenie obiektywu $10\times$ lub $20\times$).

Opracowanie wyników

Narysować kryształy związków powstałych w poszczególnych reakcjach histochemicznych (pkt. 1–8).

Literatura

Kopcewicz J., *Podstawy biologii roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.