

Vpliv železa na rast rastlin

Raziskovalno področje:

Drugo področje (živilstvo)

Raziskovalna naloga

Avtor: Tim Šinko

Mentorici: prof. Anita Mustač in prof. Vesna Hojnik

Šola: II. gimnazija Maribor

Kazalo vsebine:

Kazalo vsebine:	1
Kazalo slik:	2
Kazalo tabel:	3
Kazalo grafov:	3
Zahvala	5
1. Uvod	6
1.1 Namen in cilji raziskovalne naloge	6
1.2 Raziskovalno vprašanje	7
1.3 Hipoteze	7
2. Teoretično ozadje	8
2.1 Potrebe po železu	8
2.1.1 Vzroki za pomanjkanje železa	8
2.2 Železo kot katalizator pri nastajanju klorofila	9
2.2.1 Uporaba železa v kloroplastu	9
2.2.2 Železov (II) sulfat	9
3. Materiali in metode dela	10
3.1 Materiali	10
3.1.2 Metode dela (biološki del)	11
3.1.2.1 Namakanje semen	11
3.1.2.2 Priprava raztopin Fe(II)SO ₄	11
3.1.2.3 Zalivanje semen (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	11
3.1.2.4 Začetne meritve	12
3.1.2.5 Nadaljne meritve	12
3.1.3 Metode dela (kemijski del)	13
3.1.3.1 Priprava rastlin na sušenje	13
3.1.3.2 Sušenje rastlin	13

3.1.3.3 Žarjenje rastlin	13
3.1.3.4 Priprava regentov za umeritveno krivuljo	14
3.1.3.5 Umeritvena krivulja	14
3.1.3.6 Priprava vzorcev	15
3.2 Rezultati	16
3.2.1. Kvalitativni rezultati	16
3.2.1.1 Število vzklitih semen (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	16
3.2.1.2 Število listov na poganku nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	17
3.2.2 Kvantativni rezultati	18
3.2.2.1 Povprečna velikost pogajka in dolžina korenin	18
3.2.2.2 Povprečna suha masa rastlin	20
3.2.2.3 Koncentracija klorofila listih nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	21
3.2.2.4 Določanje koncentracij železovih (III) ionov v ekstraktih rastlin s pomočjo UV VIS spektrofotometra	22
4. Diskusija	25
5. Zaključek	27
6. Družbena odgovornost	27
Viri in literatura	28
Priloga	29

Kazalo slik:

Slika 1: Vzkrita semena po 5-ih dneh	12
Slika 2: Merjenje s klorofilmetrom (SPAD - 502 Plus).....	12
Slika 3: Rastline pred sušenjem	13
Slika 4: Posušeni vzorci rastlin	13
Slika 5: Rastline po žarjenju	13
Slika 6: Reagenti za umeritveno krivuljo.....	14
Slika 7: Raztopine za umeritveno krivuljo.....	15
Slika 8: Primerjava listov nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) – kloroza	16

Kazalo tabel:

Tabela 1: Priprava raztopin za umeritveno krivuljo	14
Tabela 2: Število vzklitih semen nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) na posamezen dan.....	16
Tabela 3: Končno število listov na poganjkih nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh).....	17
Tabela 4: Povprečna dolžina poganjkov nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) ob koncu poskusa (po 20-ih dneh).....	18
Tabela 5: Povprečna dolžina korenin nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)	19
Tabela 6: Povprečna suha masa nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)	20
Tabela 7: Povprečna vrednost SPAD v listih nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh).....	21
Tabela 8: Raztopine za umeritveno krivuljo	23
Tabela 9: Koncentracija Fe ³⁺ v poganjkih nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh).....	24
Tabela 10: Surovi podatki o številu listov na rastlini nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh).....	29
Tabela 11: Surovi podatki o dolžini korenin rastline nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh).....	29
Tabela 12: Vsebnost klorofila v rastlini (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) v odvisnosti od koncentracije Fe(II)SO ₄ (mg/l) merjeno v SPAD merjeno po koncu poskusa (po 20-ih dneh).....	30

Kazalo grafov:

Graf 1: število vzklitih semen nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) v prvih 9-ih dneh.....	17
Graf 2: Število listov na poganjku nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)	18
Graf 3: Velikost sadik nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) v odvisnosti od koncentracije FeSO ₄ po koncu poskusa (po 20-ih dneh)	19
Graf 4: Dolžina korenin nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) v odvisnosti od koncentracije FeSO ₄ po koncu poskusa (po 20-ih dneh)	20
Graf 5: Povprečna suha masa nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)	21
Graf 6: Povprečna vrednost SPAD v listih nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh).....	22

Graf 7: Umeritvena krivulja.....	22
Graf 8: Koncentracija Fe^{3+} v ekstraktih poganjkov nizkega fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh).....	24

Zahvala

Zahvaljujem se mentoricama, za vso pomoč in nasvete tekom celotne raziskovalne naloge. Zahvaljujem se tudi laborantki, ki mi je pomagala pri lažji izvedbi praktičnega dela naloge, ter šoli, ki mi je priskrbela vse, kar sem potreboval za uspešno izvedbo naloge.

1. Uvod

Namen raziskovalne naloge je bil ugotoviti, kako železo vpliva na rast in razvoj rastlin ter absorpcijo železa v rastlino. Rastline potrebujejo izjemno majhne količine železa, a je le to kljub temu nujno potrebno za normalno rast in razvoj rastlin. Sodeluje pri številnih encimskih reakcijah v rastlini in je med drugim povezano tudi s postopkom nastajanja klorofila. Železo je eden od esencijskih elementov, ki imajo v človeškem telesu številne pomembne vloge, saj sodeluje pri prenosu kisika, prav tako pa deluje kot kofaktor pri presnovi številnih hranil. Zato je vsebnost železa v hrani bistvenega pomena. Namen raziskovalne naloge je bil ugotoviti, kako različne količine železa v raztopini za zalivanje vplivajo na rast in razvoj rastlin ter na vsebnost železa v (suhih) rastlinah. Cilj raziskovalne naloge je bil ugotoviti, kako različne količine železa v raztopini za zalivanje (mg/l) vplivajo na rastline, kar bomo merili tako, da bomo beležili njihovo maso, morebitne spremembe pri rasti rastlin (npr. pojav nekroz), merili količino klorofila v listih in merili količino železa v samih rastlinah nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.). Zelene rastline uporabljajo železo za energetske pretvorbe. Kadar tla vsebujejo malo železa ali malo vodotopnega železa, imajo lahko rastline težave z rastjo. Kapaciteta privzema rastlin se močno razlikuje in ni odvisna samo od koncentracije železa v tleh, temveč tudi od vrednosti pH, koncentracije fosfatov in konkurence med železom in drugimi težkimi kovinami. Železo je bistveno mikrohranilo za skoraj vse žive organizme, saj ima ključno vlogo v večini presnovnih procesov, kot so sinteza DNA, dihanje in fotosinteza. Železo igra pomembno vlogo pri različnih fizioloških in biokemičnih poteh v rastlinah. Služi kot sestavina mnogih vitalnih encimov, zato je potrebna za širok spekter bioloških funkcij. V rastlinah železo sodeluje pri sintezi klorofila in je bistvenega pomena za vzdrževanje strukture in funkcije kloroplasta. (Rout, 2015).

1.1 Namen in cilji raziskovalne naloge

Cilj raziskovalne naloge je ugotoviti, kako različna količina železa v substratu vpliva na rastline, kar bomo spremljali tako, da bomo pri nizkem fižolu (*Phaseolus vulgaris* L.) beležili:

- hitrost kalitve,
- dolžino poganjka in korenin,
- suho maso rastlin,

- morebitne spremembe pri rasti rastlin (npr. pojav nekroz),
- merili količino klorofila v listih in
- merili količino železa v sami rastlini.

1.2 Raziskovalno vprašanje

- RV1: Kako količina FeSO_4 (mg/l) v substratu vpliva na hitrost kalitve semena nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*), merjeno kot število dni, potrebnih za kalitev?
- RV2: Kako količina FeSO_4 (mg/l) v substratu vpliva dolžino poganjka in korenine (cm) nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*)?
- RV3: Kako količina FeSO_4 (mg/l) v substratu vpliva na suho maso (g) nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*)?
- RV4: Kako količina FeSO_4 (mg/l) v substratu vpliva na količino klorofila (SPAD) v listih nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*).
- RV5: Kako količina FeSO_4 (mg/l) v substratu vpliva na prevzem železa v rastlino nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*), merjeno kot količina železovih III. ionov (Fe^{3+}) (mg/l) v celotni rastlini (od korenin do listov)?

1.3 Hipoteze

- H1: Večja kot bo vsebnost FeSO_4 (mg/l) v substratu, hitreje bodo semena nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*) vzknila.
- H2: Večja kot bo vsebnost FeSO_4 (mg/l) v substratu, večja bo dolžina poganjka in korenine (cm) nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*).
- H3: Večja kot bo vsebnost FeSO_4 (mg/l) v substratu, večja bo suha masa (g) rastlin nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*).
- H4: Večja kot bo vsebnost FeSO_4 (mg/l) v substratu, večja bo količina klorofila (SPAD) v listih nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*).
- H5: Večja kot bo vsebnost FeSO_4 (mg/l) v substratu, večji bo prevzem železa v rastlino nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*), merjeno kot količina železovih III. ionov (Fe^{3+}) (mg/l) v celotni rastlini (od korenin do listov).

2. Teoretično ozadje

2.1 Potrebe po železu

Železo je mikrohranilo, ki ga, kot vsa ostala mikrohranila, rastline potrebujejo v majhnih količinah. Železo je tretje najbolj omejujoče hranilo za rast rastlin. Pomanjkanje železa je pogosta metabolna nepravilnost pri številnih rastlinah, kar ima za posledico slab pridelek in zmanjšano prehransko kakovost. V rastlinah je železo vključeno v sintezo klorofila in je bistvenega pomena za vzdrževanje strukture kloroplasta in njegovega delovanja. Kot četrty najbolj razširjeni element v litosferi je železo na splošno prisotno v tleh v velikih količinah; vendar je njegova biološka uporabnost v določenih primerih omejena. V aerobnih tleh je pretežno železo najdeno v obliki Fe^{3+} . V večini primerov ta oblika ne zadostuje za potrebe rastlin. Vendar moramo paziti, saj lahko železo v prevelikih količinah potencialno strupeno in lahko poškoduje vitalne celične sestave (npr. membrane). Tako rastline, ki rastejo v tleh z visokim pH, niso zelo učinkovite pri razvoju in stabilizaciji klorofila. Pomanjkanje železa v rastlini se začne kazati v večih stopnjah:

- Zeleno-rumena kloroza, ki je razvidna od znotraj navzven pri mlajših listih in poganjkih. Žile večinoma ostanejo zelene,
- Nadaljevanje kloroze listov do včasih skoraj bele barve. Tudi veliki listi porumenijo, kar zavira rast,
- Zmanjšano število plodov in upočasnjeno razvijanje koreninskega sistema,
- V hudih primerih je opazno odmiranje listov, rast in cvetenje pa sta zavirata. Rastlina lahko postopoma odmre.

2.1.1 Vzroki za pomanjkanje železa

K maksimalnemu izkoristku železa tako bistveno vpliva tudi kislost podlage. Tla z bazičnim pH (7,5-8,2), verjetno ne bodo imela veliko razpoložljivega železa. Pomanjkanje železa je pogosta motnja mikrohranil na nevtralnih, apnenčastih, alkalnih in dobro izsušenih tleh. Resnost motnje pa narašča s pH vrednostjo. V dobro odcedenih tleh s pH nad 6,5 najverjetneje primanjkuje razpoložljivega železa. Tudi visoka koncentracija CaCO_3 bo poslabšala pomanjkanje zaradi svojih bazičnih lastnosti. Pomanjkanje železa lahko posledično poveča količino nitratov, ki prav tako zvišujejo pH tal okoli korenin. Tudi uporaba fosfata lahko poslabša njegovo pomanjkanje ali ovira njegovo presnovo ali transport v poganjke. Posledično

so previsoke ravni fosfatov in nitratov lahko posledica uporabe nekaterih gnojil. Pomanjkanje železa je, v zgoraj opisanih pogojih, še pogostejše ob pomanjkanju sončne svetlobe in nizkih temperaturah okoli korenin, saj nižje temperature v koreninskem okolju upočasnijo metabolizem in rastlina absorbira manj železa. Seveda lahko pomanjkanje železa preprečimo tako, da držimo nivo pH med 5,5 in 6,5, nivo svetlobe in temperature. Presežek bakra, mangana in cinka v substratu se tudi kaže kot vzrok za pomanjkanje železa. Gre namreč za ravnotežje med različnimi dejavniki, ki vplivajo na rast rastline.

2.2 Železo kot katalizator pri nastajanju klorofila

Klorofili podpirajo fotosintezo, ki ustvarja kisik. Ta podpira vso zapleteno življenje na Zemlji. Letna proizvodnja klorofila na kopnem in v oceanih je na ravni milijard ton, vendar encimske komponente biosintezne poti niso niti popolnoma določene, niti sestavljene, da bi opredelile minimalni nabor genov, potrebnih za tvorbo klorofila. Biosintetska pot klorofila je veja biosinteze tetrapirola in se začne s protoporfirinom IX (PPIX), ki je tudi predhodnik biosinteze hema. Hem je kofaktor za dihalne beljakovine, pretvori pa se tudi v biline, linearne tetrapirole, ki se uporabljajo kot pigmenti za pridobivanje svetlobe pri cianobakterijah. (Moulin, Smith. 2005)

2.2.1 Uporaba železa v kloroplastu

Večina beljakovin kloroplasta je kodiranih v jedru, prevedena na citoplazemskih 80S ribosomih in uvožena v organele. Kloroplastni genom kodira niz beljakovin, ki delujejo pri fotosintezi ali izražanju genov za kloroplast. Tako razvoj rastlin, kot tudi okolje vplivata na delovanje kloroplasta. Razpoložljivost mikrohranil (vključno s železom) je ena pomembnejših okoljskih spremenljivk. Zaradi svoje vloge beljakovinskega kofaktorja je železo potrebno za številne biološke procese. Železni kofaktorji obstajajo v treh glavnih oblikah (hem, nehem in grozdi Fe-S), da beljakovinam omogočajo izvajanje funkcij, kot so kataliza, prenos elektronov... Železo je najpogostejši kovinski kofaktor, železni kofaktorji pa ponujajo vrsto različnih potencialov za različne beljakovinske funkcije.

2.2.2 Železov (II) sulfat

Železov (II) sulfat ali zelena galica, označuje vrsto modrozelenih soli s kemijsko formulo FeSO_4 . Vsi železovi (II) sulfati so dobro topni v vodi, da dobijo isti vodni kompleks $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, ki ima oktaedrično molekularno geometrijo. 5% vodna raztopina ima, pri 20°C, pH

približno 3, kar vpliva na spremembo kislosti zemlje (substrata) in znižuje pH-vrednost v alkalni zemlji, tako da lahko rastline dostopajo do hranilnih snovi v tleh. V vrtnarstvu se železov sulfat uporablja tudi za zdravljenje kloroze, ki je značilna ob pomanjkanju železa. Čeprav ne deluje tako hitro kot nekatere druge spojine (železova EDTA), so pa njegovi učinki dolgotrajnejši. (Wikipedija, 2017).

3. Materiali in metode dela

Nalogo sem razdelil na biološki in kemijski del. Z biološkim delom naloge želimo dokazati, da količina železa vpliva na rastlino vse od kalitve do razvoja odrasle rastline nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.). Spremljali smo tudi razvoj rastline in zabeležili morebitne anomalije (pojav nekroz, kloroza itd.), merili količino klorofila v listih rastline in ugotavljali in merili razlike v velikosti in suhi masi rastlin. S kemijskim delom pa smo želel dokazati povezavo med koncentracijo raztopine FeSO_4 , s katero smo zalivali semena, in prevzemom železa v rastline, merjeno v obliki Fe^{3+} ionov v rastlini v mg/l.

3.1 Materiali

- Plastični lončki velikosti (5,5 x 5 x 5,5)cm.
- Substrat, uporabljen v raziskavi, je proizvedlo podjetje Humko. Vrednost pH je rahlo kislja (6,2), kar pomeni, da substrat ne bo zaviral prevzema železa v rastlino. Druga hranila, prisotna v substratu, so sledeča: 200-300 mg dušika (N_2)/l, 200-250 mg fosfata (P_2O_5)/l in 200-300 mg kalijevega (II) oksida (K_2O)/l. Vsebnost mikrohranil (kot je tudi železo) je v substratu prisotna le v sledovih.
- Klorofilometer (SPAD – 502 Plus)
- Semena nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.). uporabili smo 36 semen, po 6 semen v vsaki izmed skupin.
- UV VIS spektrofotometer
- Peč za sušenje
- 15ml 2 M raztopine HCl (2 molarna raztopina klorovodikove kisline)
- 4,86g KSCN (kalijeve tiocianat)
- 0,68g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (železov (III) klorid heksahidrat)
- 150g $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Železov sulfat heptahidrat)
- 12,5ml 0,1 M raztopine KSCN (0,1 molarna raztopina kalijevega tiocianata)
- 0,5ml 0,05 M FeCl_3 (0,05 molarna raztopina železovega (III) klorida heksahidrata)

- 6 žarilnih posodic
- Gorilnik
- Tehnica
- Spatula

3.1.2 Metode dela (biološki del)

3.1.2.1 Namakanje semen

Pred začetkom sajenja in merjenja smo predhodno namočili 36 semen nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) in jih pustil stati v vodi čez noč (12ur). Naslednji dan smo s 30g enakega substrata napolnil posodice za sajenje in vanje posadil semena fižola.

3.1.2.2 Priprava raztopin FeSO₄

Nakar smo si pripravil 5 različnih koncentracij vodne raztopine FeSO₄ s 10 mg (FeSO₄)/l, 20 mg (FeSO₄)/l, 30 mg (FeSO₄)/l, 40 mg (FeSO₄)/l in 50 mg (FeSO₄)/l. Lončke, v katere smo posadili seme nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.), smo razdelili v 6 skupin po 6 lončkov v vsaki skupini.

3.1.2.3 Zalivanje semen (*Phaseolus vulgaris* L.)

Vsako skupino smo zalivali s različnimi raztopinami FeSO₄. Substrat smo zalivali vsak dan z enakim volumnom ustrezne koncentracije raztopine. Prvi dan smo vse lončke zalili z enakim volumnom vodovodne vode (10 ml), nakar smo začeli dodajati raztopine železovega (II) sulfata (10ml/dan). Določili smo kontrolno skupino, ki smo jo skozi ves čas raziskave zalivali z vodovodno vodo. Drugo skupino smo zalivali z 10 mg FeSO₄/l, tretjo skupino z 20 mg FeSO₄/l, četrto skupino z 30 mg FeSO₄/l, peto skupino z 40 mg FeSO₄/l in šesto skupino z 50 mg FeSO₄/l. Z 10 ml ustrezne raztopine smo rastline zalivali prvih 5 dni. Po tem začetnem obdobju se je zemlja navlažila, zato smo lahko prešli na manjši volumen raztopine in sicer 5 ml. Tako smo nadaljevali nadaljnjih 5 dni. Po 10 dneh zalivanja smo rastline začeli vlažiti z 3 ml ustrezne raztopine. Vsebnost železa v vodovodni vodi je bila v skladu s zahtevami nacionalnega inštituta za javno zdravje republike Slovenije, kar pomeni da je vsebovala manj kot 2mg železa/l. (Javno podjetje Prekija, 2020 in NIJZ, 2014)

3.1.2.4 Začetne meritve

Po 20 dneh rasti smo zaključili testno obdobje rasti. Rastline so se razvile do te mere, da smo lahko izmerili razlike.

3.1.2.5 Nadaljne meritve

Za vse nadaljne meritve smo pustili rastline rasti 5 dni. Po začetnih dneh so bile dovolj razvite, da smo lahko začeli ugotavljati razlike v velikosti poganjkov. Tako smo začeli zapisovati napredek v rasti in računati aritmetično sredino meritev (6 semen v vsaki skupini) za posamezen dan. Meritve so zapisane v centimetrih (cm), nevzkaljeno seme pa je bilo pri računanju aritmetične sredine upoštevano kot vrednost 0.



Slika 1: Vzklita semena po 5-ih dneh



Slika 2: Merjenje s klorofilmetrom (SPAD - 502 Plus)

3.1.3 Metode dela (kemijski del)

3.1.3.1 Priprava rastlin na sušenje

Ko so bile rastline pobrane iz zemlje, smo jih pripravili za sušenje.



Slika 3: Rastline pred sušenjem

3.1.3.2 Sušenje rastlin

Rastline smo sušili 12 ur pri 40 stopinjah celzija. Suhe rastline smo zdrobili in homogenizirali in z njimi napolnili žarilne posodice.



Slika 4: Posušeni vzorci rastlin

3.1.3.3 Žarjenje rastlin

Najpej smo stehali čiste in suhe žarilne lončke. Nato smo v vsako izmed posodic natehtali 0,5g rastlin in jih ustrezno označili. Pripravljene žarilne lončke smo postavili v žarilno peč pri 500 stopinjah celzija, jih žarili 3 ure oziroma dokler ni iz njih nastal siv ali bel pepel. Le-ta ni smel vsebovati črnih delcev. V ta namen smo jih, pred nadaljnim delom, izločili. Po končanem žarjenju smo pustili, da se je žarilni lonček ohladil na sobno temperaturo in ponovno stehali maso žarilnega lončka. Žarilne posodice smo ustrezno označili in shranili za nadaljne poskuse.



Slika 5: Rastline po žarjenju

3.1.3.4 Priprava reagentov za umeritveno krivuljo

Pripravili smo 2 M raztopino HCl, 0,1 M Raztopino KSCN in 0,05 M raztopino FeCl₃.

Priprava:

- 4,86g KSCN/50 ml H₂O,
- 1,35g FeCl₃/100 ml H₂O,
- 2 M HCl

Priprava raztopine diluenta: zmešali smo 3ml vode, ji dodali 5ml 0,05 M raztopine FeCl₃ (0,68 g/50 ml) in 5ml 2 M HCl.

Osnovna raztopina železovega (III) tiocianatnega kompleksa: Zmešali smo 0,5ml 0,05 M raztopine FeCl₃, 2,5ml vode in 5ml 0,1 M raztopine KSCN ter 5ml 2 M HCl.



Slika 6: Reagenti za umeritveno krivuljo

3.1.3.5 Umeritvena krivulja

Po priloženem grafu smo namešali umeritvene raztopine.

Tabela 1: Priprava raztopin za umeritveno krivuljo

	$\gamma(\text{Fe}^{3+})$ (mg/l)	Osnovna raztopina kompleksa $V(\mu\text{L})$	Raztopina diluenta $V(\mu\text{L})$
Umeritvena raztopina 1	13,9	50	400
Umeritvena raztopina 2	23,1	100	350
Umeritvena raztopina 3	39,0	150	300
Umeritvena raztopina 4	45,0	200	250
Umeritvena raztopina 5	59,8	250	200
Umeritvena raztopina 6	70,1	300	150

Umeritvena raztopina 7	86,0	350	100
Umeritvena raztopina 8	97,5	400	50
Umeritvena raztopina 9	110,0	450	0

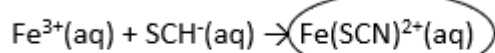


Slika 7: Raztopine za umeritveno krivuljo

Z UV VIS spektrofotometrom smo izmerili absorbance pri valovni dolžini 525,6nm.

3.1.3.6 Priprava vzorcev

Pepel, pripravljen s postopkom žarenja, smo raztopili v 2,5ml 2 M klorovodikove kisline. Komplekse železovih (III) ionov smo tvorili s pomočjo tiocianatnih ionov. Tako so železovi (III) ioni skupaj z tiocianatnimi ioni tvorili vrsto oranžno-rdeče obarvanih kompleksov. Tiocianat je eden najstarejših reagentov za določanje železa (III) v vzorcih različnih snovi. Prvo stopnjo reakcije predstavlja spodnja enačba:



Oranžno-rdeči tiociatni kompleks

Po dodani 2 M HCl smo žarilne posodice dali na vodno kopel in segrevali, dokler ni iz žarilnih posodicah izparela vsa HCl.

Žarilne posodice smo ohladili in vzorcu dodali 1,5ml destilirane vode, 2,5ml 2 M HCl in 2,5ml 0,1 M KSCN. Dobljeno raztopino smo filtrirali in filtrat shranili. Ker je bila barva filtrata preintenzivna za merjenje s UV VIS spektrofotometrom, smo naredili 20-kratno razredčitev.

3.2 Rezultati

V osnovi smo ločili rezultate na kvalitativne in kvantativne.

3.2.1. Kvalitativni rezultati

Slika 8 na levi prikazuje fižol, ki je zrastle pri koncentraciji 50 mg/l, slika na desni pa fižol, ki je zrastle v kontrolni skupini, kjer je jasno viden pojav listne nekroze.

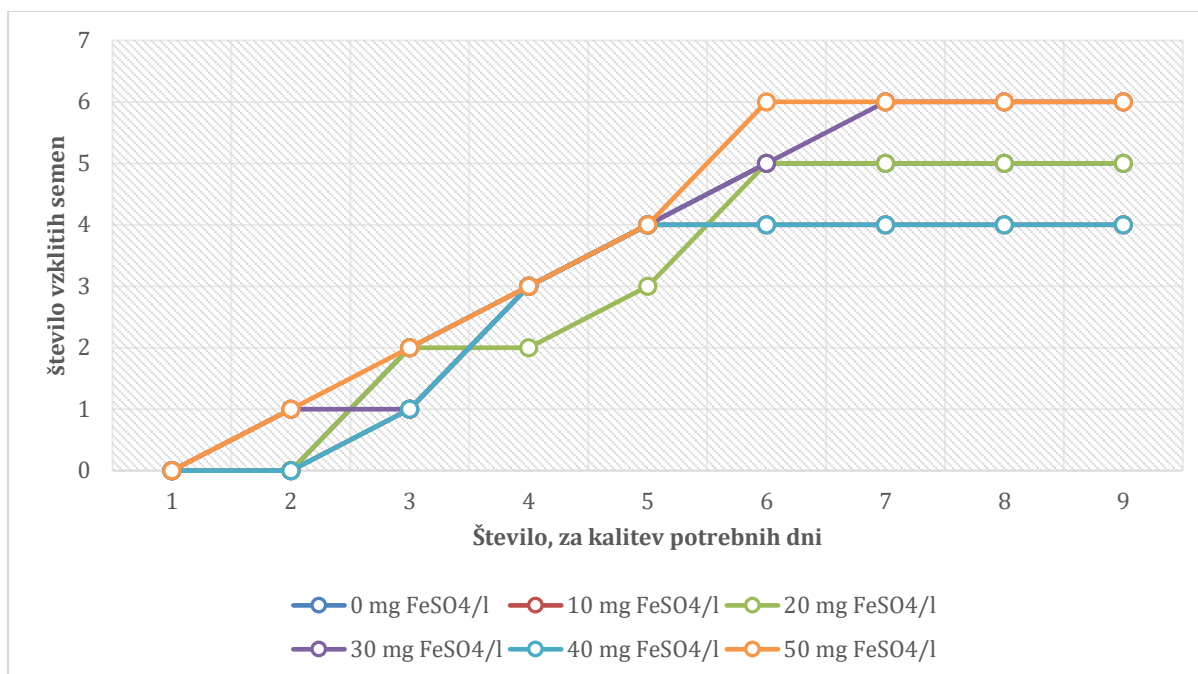


Slika 8: Primerjava listov nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) – kloroza

3.2.1.1 Število vzklih semen (*Phaseolus vulgaris* L.)

Tabela 2: Število vzklih semen nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) na posamezen dan

	Dan								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Koncentracija FeSO ₄ (mg/l)	Število vzklih semen								
0	/	/	2	3	4	5	5	5	5
10	/	/	1	3	4	4	4	4	4
20	/	/	2	2	3	5	5	5	5
30	/	1	1	3	4	5	6	6	6
40	/	/	1	3	4	4	4	4	4
50	/	1	2	3	4	6	6	6	6



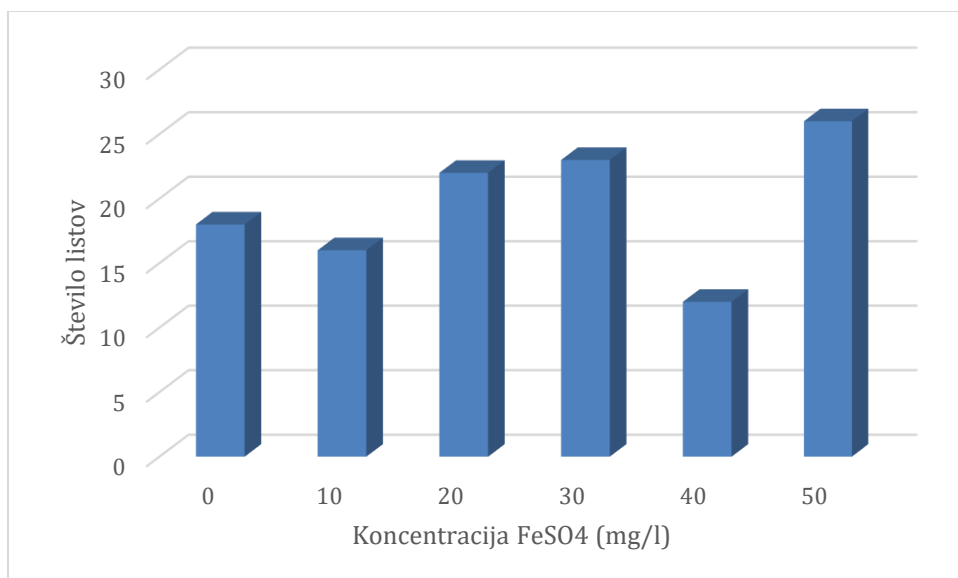
Graf 1: število vzklitih semen nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) v prvih 9-ih dneh

3.2.1.2 Število listov na poganjku nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.)

Surovi podatki o številu listov na poganjkih nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh) so podani v prilogi 1.

Tabela 3: Končno število listov na poganjkih nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

Koncentracija FeSO ₄ (mg/l)	Število listov
0	18
10	16
20	22
30	23
40	12
50	26



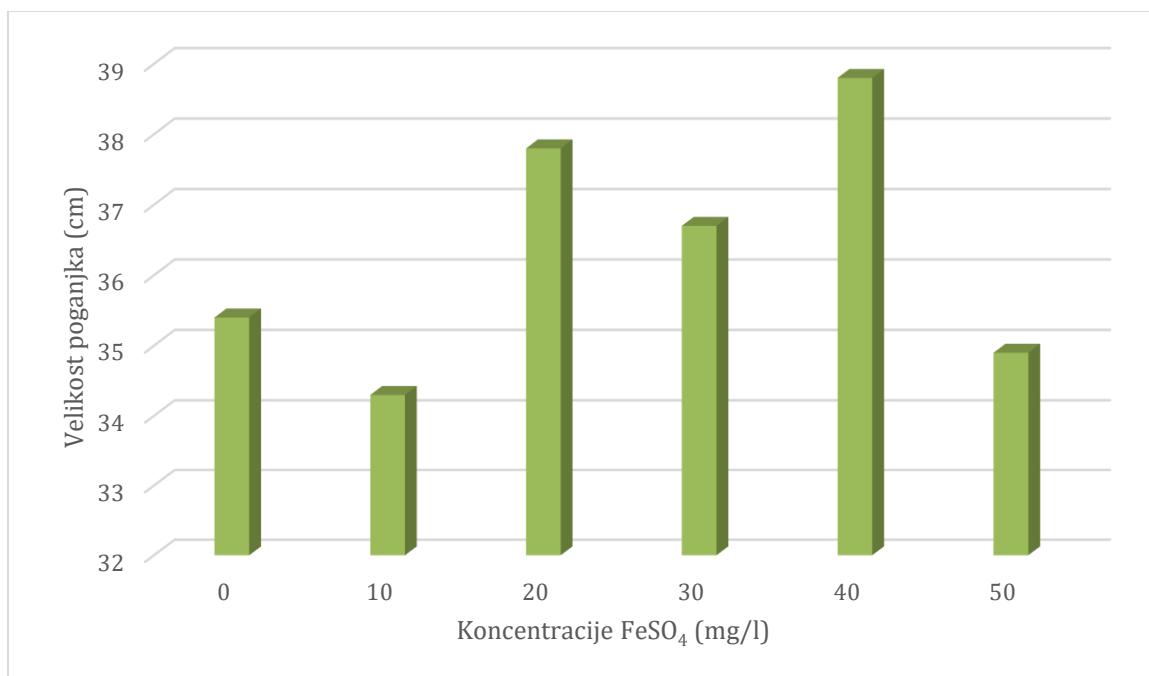
Graf 2: Število listov na poganjku nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

3.2.2 Kvantativni rezultati

3.2.2.1 Povprečna velikost pogajka in dolžina korenin

Tabela 4: Povprečna dolžina poganjkov nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) ob koncu poskusa (po 20-ih dneh)

Koncentracija FeSO ₄ (mg/l)	Velikost poganjka (cm)
0	35,4
10	34,3
20	37,8
30	36,7
40	38,8
50	34,9

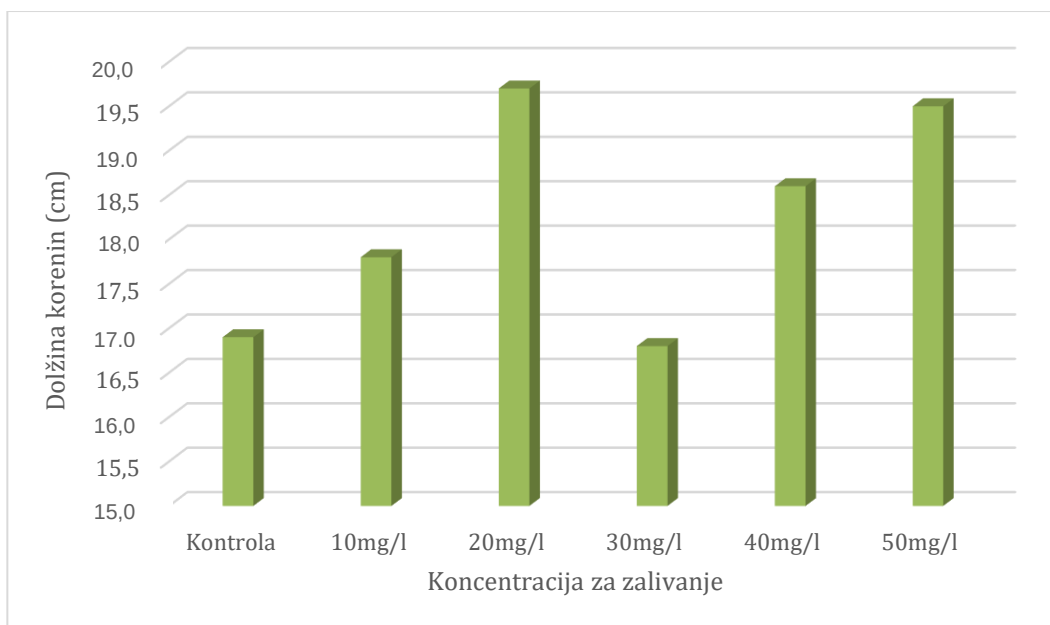


Graf 3: Velikost sadik nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) v odvisnosti od koncentracije FeSO₄ po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

Surovi podatki o dolžinah korenin poganjkov nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris*) po koncu poskusa (po 20-ih dneh) so podani v prilogi 2.

Tabela 5: Povprečna dolžina korenin nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

Skupina	Povprečna dolžina korenin (cm)
skup. 1	16,9
skup. 2	17,8
skup. 3	19,7
skup. 4	16,8
skup. 5	18,6
skup. 6	19,5

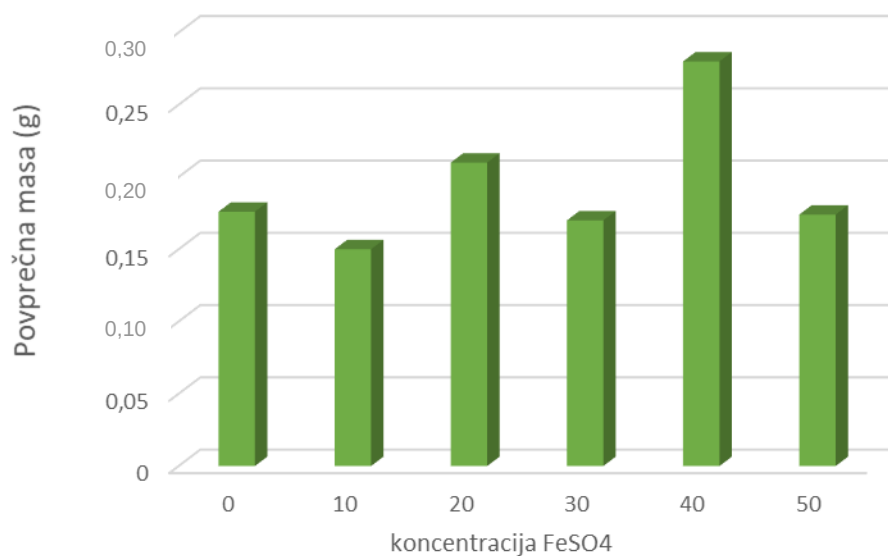


Graf 4: Dolžina korenin nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) v odvisnosti od koncentracije FeSO_4 po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

3.2.2.2 Povprečna suha masa rastlin

Tabela 6: Povprečna suha masa nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

Koncentracija FeSO_4 (mg/l)	Povprečna masa (g)
0	0,176
10	0,150
20	0,210
30	0,170
40	0,280
50	0,174



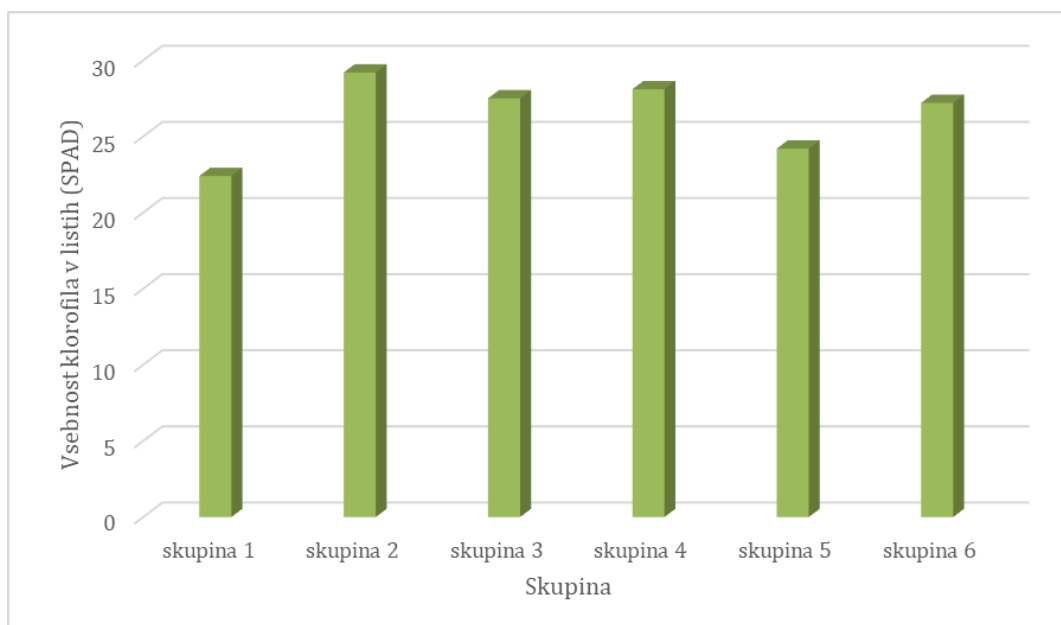
Graf 5: Povprečna suha masa nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

3.2.2.3 Koncentracija klorofila listih nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.)

Surovi podatki o vsebnosti klorofila v listih (SPAD) nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh) so predstavljeni v prilogi 3.

Tabela 7: Povprečna vrednost SPAD v listih nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

Koncentracija FeSO ₄	Povprečna količina klorofila v listu (SPAD)
0	22,4
10	29,2
20	27,5
30	28,1
40	24,2
50	27,2

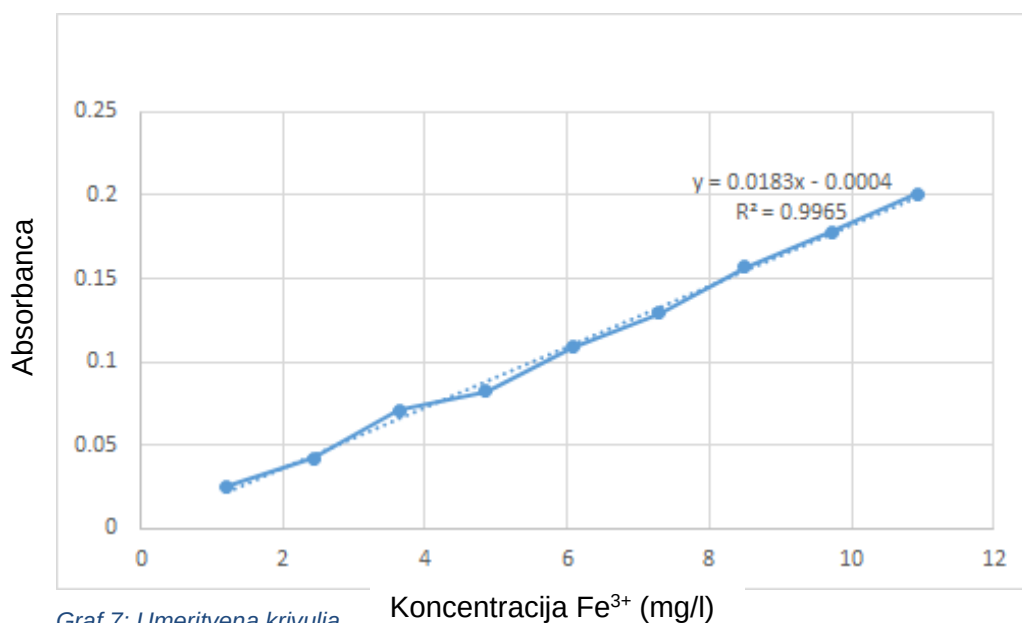


Graf 6: Povprečna vrednost SPAD v listih nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

Vrednost SPAD izhaja iz specifične absorbanca (absorbanca na mol) klorofila a. Izračunane enote so mg klorofila na liter vode.

3.2.2.4 Določanje koncentracij železovih (III) ionov v ekstraktih rastlin s pomočjo UV VIS spektrofotometra

Na podlagi rezultatov smo pripravili umeritveno krivuljo, ki smo jo dodatno opremili z linearno enačbo premice $y = 0.0183x - 0.0004$, kjer x predstavlja koncentracijo in y absorbanco.



Graf 7: Umeritvena krivulja

$$\text{koncentracija} = \frac{A + 0,0004}{0,0183} \times \text{redčitveni faktor}$$

Korelacijski faktor R^2 je **0,9965**.

Tabela 8: Raztopine za umeritveno krivuljo

Umeritvene raztopine	Absorbanca (525,6nm)	Koncentracija Fe^{3+} v razredčeni raztopini (mg/l)	Koncentracija Fe^{3+} v osnovni raztopini (mg/l)
1	0,025	1,3	13,9
2	0,042	2,3	23,1
3	0,071	3,9	39,0
4	0,082	4,5	45,0
5	0,109	5,9	59,8
6	0,129	7,0	70,1
7	0,157	8,6	86,0
8	0,178	9,7	97,5
9	0,201	11,0	110,0

Primer izračuna koncentracije železa v ekstraktu rastlin v vzorcu 1:

$$\text{koncentracija (vzorec 1)} = \frac{0,081 + 0,0004}{0,0183} \times 20$$

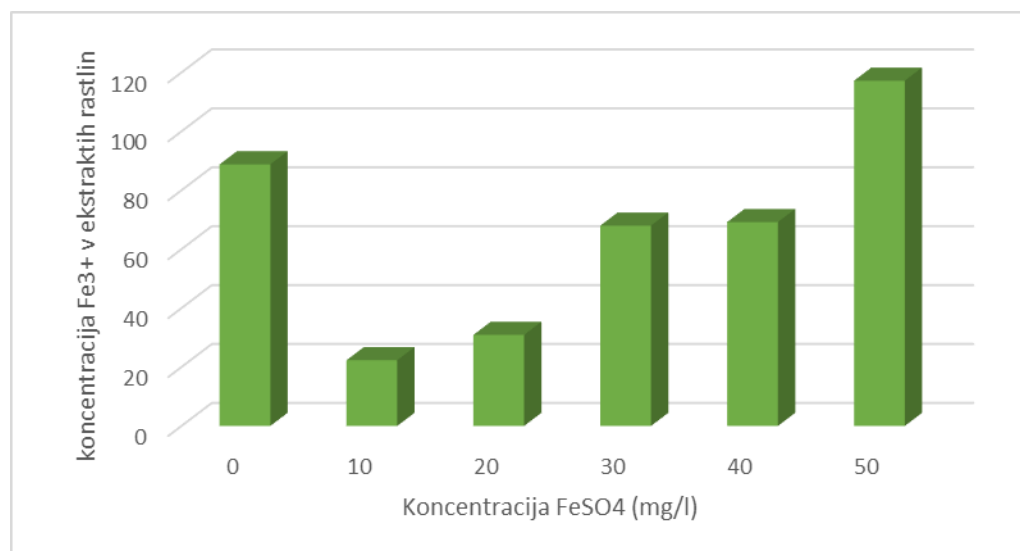
Tabela 9: Koncentracija Fe^{3+} v poganjkih nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

Vzorec	Absorbanca (525,6nm)	Koncentracija Fe^{3+} v razredčeni raztopini (mg/l)
Vzorec 1	0,081	88,8
Vzorec 2	0,020	22,3
Vzorec 3	0,038	30,9
Vzorec 4	0,062	68,0
Vzorec 5	0,063	69,2
Vzorec 6	0,107	117,2

Za računanje koncentracije Fe^{3+} v rastlini je bila uporabljena splošna enačba,

$$\text{koncentracija} = \frac{A + 0,0004}{0,0183} \times \text{redčitveni faktor}$$

s redčitvenim faktorjem 20.



Graf 8: Koncentracija Fe^{3+} v ekstraktih poganjkov nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

4. Diskusija

Namen raziskovalne naloge je bil ugotoviti, kako različne koncentracije razpoložljivega železa vplijo na rastlino nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*), kar smo spremljali tako, da smo beležili: hitrost kalitve semena nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*), dolžino samih poganjkov, koreninskega sistema, suho maso poganjkov ob koncu poskusne dobe 20-ih dni. Prav tako pa smo ob koncu izmerili še količino klorofila v listih nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*), ter vsebnost železovih (III) ionov v suhih poganjkih po 20-ih dneh. Skozi celoten postopek raziskovanja smo bili pozorni tudi na nastanek kakršnih koli sprememb pri rasti rastline (npr. pojav nekroz).

Najprej smo se vprašali, kako količina FeSO_4 (mg/l) v substratu vpliva na hitrost kalitve semena nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*), merjeno kot število dni, potrebnih za kalitev. Po 9-ih dneh, ko se je začetno obdobje rasti zaključilo in je vzklilo 83% vseh semen nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*), smo prišli do ugotovitve, da koncentracija železa močno vpliva na hitrost kalitve. Tabela 2 nam prikazuje število dni, potrebnih za kalitev nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*), od koder je razvidno, da je železo kalitev močno pospešilo. Semena, ki so bila zalivana s 50mg FeSO_4 /l vode kalila precej hitreje, kot naprimer kontrolna skupina. S tem poskusom smo tako podrdili prvo hipotezo, ki predpostavlja, da bodo semena, ki bodo rastle v višjih koncentracijah FeSO_4 v substratu vzklila hitreje. Sorodna raziskava je merila vpliv železa na rast in razvoj navadnega trsa (*Phragmites australis*) in dokazala, da so se sadike izpostavljene koncentraciji do 1mg Fe/l razvijale normalno ali celo hitreje kot poprej, medtem ko so koncentracije nad 2 mg Fe/l začele kazati številne spremembe v morfologiji, kar vključuje zaviranje rasti, porumenelos listov... (Bot, 2003) Rastline potrebujejo za svoj razvoj različne koncentracije železa, kar je v tem primeru lepo vidno, saj so naša semena najbolje uspevala v koncentracijah med 20 in 40mg FeSO_4 /l. Predlagamo, da se pred začetkom zdravljenja rastline z železom, predhodno pozanimamo o potrebah te rastline, saj lahko železova gnojila (ETDA, FeSO_4) povzročijo tudi nezaželjene učinke v primeru njihove napačne uporabe.

Zanimalo nas je tudi, kako količina FeSO_4 (mg/l) v substratu vpliva dolžino poganjka in korenine (cm) nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*). Grafa 3 in 4 nam prikazujeta povprečno dožino poganjkov in korenin nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris L.*). Spet smo prišli do ugotovitve, da ima železo velik vpliv tudi na dolžino poganjkov in korenin. V naši raziskavi se je kot optimalna koncentracija uveljavila 20mg/l. Pri tej koncentraciji so se sadike razvijale

najhitreje. V primerjavi s prej omenjeno raziskavo ne moramo potrditi morfoloških sprememb ob prevelikih koncentracijah FeSO_4 , saj se je nekroza (listna bledica) ni pojavila pri nobeni izmet koncentracij višjih od 20mg/l. S tem poskusom smo potrdili drugo hipotezo, ki predpostavlja, da bo povečana vsebnost FeSO_4 (mg/l), večja bo dolžina poganjka in korenine (cm) nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.).

Pri suhi masi rastlin pa bi lahko sklepali po začetkih toksičnosti železa. Po zelo uspešnih meritvah pri kontrolni skupini je masa rastline postopoma upadla. Vzpon smo zaznali pri koncentracijah med 20mg/l in 40mg/l, medtem ko je suha masa pri koncentraciji nad 50mg/l ponovno močno upadla. Pri raziskavi, ki je vplive železa opazovala na podlagi mandarin so prav tako kot mi, zaznali upad suhe mase pri presežkih železa. Hipotezo 3, ki pravi, da večja kot bo vsebnost FeSO_4 (mg/l) v substratu, večja bo suha masa (g) rastlin nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) lahko le delno potrdimo. Količina železa povečuje suho maso rastlin do določene točke, kjer pa jo začne zavirati.

Znano je, da je železo katalizator pri nastajanju klorofila, zato smo raziskali kako količina FeSO_4 (mg/L) v substratu vpliva na količino klorofila (SPAD) v listih nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.). Po naših raziskavah železo vsekakor vpliva na količino klorofila v listih, saj so bile čisto vse koncentracije v povprečju boljše od kontrolne skupine, s čimer smo potrdili 4. hipotezo. To lahko podkrepimo tudi z rezultati nam zelo sorodne raziskave, kjer so z večanjem koncentracije železa izmerili tudi povečano koncentracijo klorofila v črnem fižolu (*Vigna unguiculata*). (Evans, Marsh, Matrone, 1963).

Ob koncu poskusov smo izmerili še stopnjo prevzema železa v rastline, merjeno kot prisotnost Fe^{3+} v rastlini (mg/l). Vsebnost železa je bila zelo visoka že v kontrolni skupini in nato padla. Izrazit vzpon je bil ponovno zaznan pri koncentraciji 50 mg/l, vendar smo, s primerjanjem rezultatov prejšnjih poskusov prišli do zaključka, da je optimalna količina železa v rastlini, za normlen razvoj rastline med 30,9 mg/l in 69,2 mg/l. V tem območju so bile rastline, v povprečju, najdalše, imele najboljše razvit koreninski sistem in samo število ter barva listov, merjena kot koncentracija klorofila v njih (SPAD) bili najboljši. Surovi podatki o količini listov so predstavljeni v Prilogi 1.

5. Zaključek

Ker je kloroplast glaven za železo v rastlini, je nujno razumeti, kako kloroplast nadzira železo in kako se odziva na pomanjkanje, da ohrani fotosintezo. Fotosintetični organizmi delijo odzive na pomanjkanje železa, zaradi zmanjšane količine fotosinteze in sklopa grozdov SUF Fe-S. Naše razumevanje regulacije prilagajanja kloroplasta na pomanjkanje železa je omejeno. Najverjetneje je prilagajanje pomanjkanja kloroplasta na pomanjkanje železa urejeno z večkratnimi transkripcijskimi, posttranskripcijskimi in posttranslacijskimi mehanizmi, kot so opazili pri cianobakterijah (Balparda, Armas, Estavillo, Roschztardt, Pagani, 2020). Grozdi Fe-S so potrebni za številne fotosintetske proteine za prenos elektronov. Poleg tega je možno, da neravnovesje v fotosintetičnih mehanizmi za prenos elektronov aktivira operativne signale v jedro, da se prilagodi izražanje fotosintetskih beljakovin. Raziskave pomanjkanja železa pri rastlinah v zadnjih desetletjih so ugotovile, kako se beljakovine odzivajo na pomanjkanje železa v kloroplastu, in opredelile ključne regulativne dejavnike pri vnosu in sekvestraciji železa. Železo predstavlja osnovo za normalen razvoj organizma, vendar ga more organizem ohranjati v idealnih pogojih. V okolju s premalo železa se fotosintetski organizem ne bo mogel normalno razvijati, vendar lahko presežek železa povzroči toksičnost, ki jo razvije zaradi tvorbe prostih radikalov. (Voith von Voithenberg, Park, Stube, Lux Philippar, Novel 2019). Železo torej uspešno preprečuje nastanek listne kloroze pri nizkem fižolu, prav tako pa preprečuje nastanek nekroz in drugih morfoloških nepravilnosti.

6. Družbena odgovornost

Trg nam ponuja veliko železovih gnojil (EDTA, zelena galica...), ki nam obljublajo boljši pridelek. Naše ugotovitve priporočajo skrbnost in predvsem natančnost z uporabo. Z koncentracijo železa v raztopini za zalivanje ne smemo pretiravati, saj lahko hitro dobimo nasprotno učinke od zelenih. Pri tem povdarjamo, da se je v naši raziskavi za najbolj učinkoviti koncentracijo izkazala vodna raztopina s 20mg/l do 40mg/l. naša priporočila glede rabe železovih gnojil so torej, da železo dejansko pomaga pri izboljšanju kvalitete rastlin, a z njegovo uporabo ali koncentracijo nikakor ne smemo pretiravati.

Viri in literatura

- Balparda, M.; Armas, A.M.; Estavillo, G.M.; Roschztardt, H.; Pagani, M.A.; Gomez-Casati, D.F. (2020). The PAP/SAL1 Retrograde Signaling Pathway Is Involved in Iron Homeostasis. *Plant Mol. Biol.*
- [2] Bot, A. (2003). Effects of External Iron Concentration upon Seedling Growth and Uptake of Fe and Phosphate by the Common Reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex. Steudel. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4243622/>
- Evans, H.J., Marsh, H.V., Matrone, G. (1963). Investigations of the Role of Iron in Chlorophyll Metabolism I. Effect of Iron Deficiency on Chlorophyll and Heme Content and on the Activities of Certain Enzymes in Leaves. Dostopno na: <http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/38/6/632.full.pdf>
- Hantzis, L.J.; Kroh, G.E.; Jahn, C.E.; Cantrell, M.; Peers, G.; Pilon, M.; Ravet, K. A. (2018). Program for Iron Economy during Deficiency Targets Specific Fe Proteins. *Plant Physiol.*
- Moulin, M.; Smith, A.G. (2005). Regulation of tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Biochem. Soc. Trans.* and in aberrant chloroplast structures. *Plant Cell Environ.* 2010
- Voith von Voithenberg, L.; Park, J.; Stube, R.; Lux, C.; Lee, Y. K. A Novel. (2019). Prokaryote-Type ECF/ABC Transporter Module in Chloroplast Metal Homeostasis. *Front. Plant Sci.*
- Rev, C. (2010). Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2764373/>
- Rout, R., G. (2015). ROLE OF IRON IN PLANT GROWTH AND METABOLISM. Dostopno na: https://www.jstage.jst.go.jp/article/ras/3/0/3_1/article
- Wikipedija (2017). Železov(II) sulfat. Dostopno na: <https://bit.ly/39bukSB>
- LETNO POROČILO O SKLADNOSTI PITNE VODE (Ljutomer, 2020). Dostopno na; http://www.jp-prlekija.si/uploads/File/oskrba_s_pitno_vodo/Letno_porocilo_2020.pdf
- Z ZNANJEM DO BOLJŠEGA ZDRAVJA, nacionalni inštitut za javno zdravje republike Slovenije (2014). Dostopno na: <https://www.nijz.si/sl/o-posameznih-parametrih-na-kratko>

Priloga

Tabela 10: Surovi podatki o številu listov na rastlini nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

Skup./dan	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	Število listov													
skup. 1	4	6	6	6	8	10	10	10	10	11	11	14	15	18
skup. 2 /		4	8	8	8	8	8	8	8	9	11	13	15	16
skup. 3 /		4	6	6	8	8	10	10	10	12	12	18	22	22
skup. 4	1	6	10	10	12	12	12	12	12	15	16	18	23	23
skup. 5 /		2	4	4	6	6	6	6	6	6	6	8	12	12
skup. 6	4	6	10	10	12	12	12	12	12	14	18	18	21	26

V tabeli 9 predstavlja skup. 1 koncentracijo 0 mg/l, skup. 2 10 mg/l, skup.3 20 mg/l, skup. 4 30 mg/l, skup. 5 40mg/l in skup. 6 50 mg/l

Tabela 11: Surovi podatki o dolžini korenin rastline nizkega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

Koncentracija FeSO ₄	Dolžina korenin (cm)
0	6,3
	19,6
	28,6
	16,4
10	13,6
	22,4
	10,4
	23
	15,4
20	14,5
	23,7
	20,8
	11,7
	27,7
30	17,1
	20,1
	16,4
	23,7
	7,5
40	16,1
	21,5
	17,4
50	17,1
	19,9
	20,3
	13,1
	15,9
	27,6
	27,3

Tabela 12: Vsebnost klorofila v rastlini (*Phaseolus vulgaris* L.) v odvisnosti od koncentracije Fe(II)SO₄ (mg/l) merjeno v SPAD merjeno po koncu poskusa (po 20-ih dneh)

Koncentracija FeSO ₄ (mg/l)	vsebnost klorofila v listih (SPAD)					
0	26.0	22.5	31.8	5.7		
	28.1	29.7	29.2	6.0		
	27.4	28.0	27.8	6.3		
10	30.9	26.6	29.2	25.9		
	32.8	29.1	28.1	28.4		
	31.3	30.3	29.3	28.0		
20	25.9	27.6	28.4	25.4	29.4	
	26.6	28.6	26.7	28.1	28.5	
	25.7	26.2	28.3	29.9	27.7	
30	28.6	28.2	27.4	30.6	25.2	28.5
	26.0	31.2	24.7	27.9	28.1	30.7
	26.4	29.8	26.0	26.9	28.4	30.8
40	22.2	24.2	25.8			
	20.7	26.3	28.1			
	21.7	25.4	23.5			
50	23.1	27.7	23.9	27.6	28.5	24.0
	27.5	25.3	26.7	28.8	30.8	28.8
	29.0	27.1	26.3	28.7	28.0	27.3