

Měření rychlosti čistého příjmu nitrátu sledováním úbytku NO_3^- z roztoku

Hodnocení vlivu indukce na rychlost příjmu, sledování kinetiky příjmu

1. Obilky kukuřice a slunečnice necháme cca 5-7 dní naklíčit na miskách s polyethylenovými (PE) perlami zalitými vodou.
2. Vzrostlé semenáčky potom přesadíme do míchané vodní kultury. Kultivační vanu (16 pozic, 6 L) naplníme živným roztokem o poloviční koncentraci (1,25 ml každého zásobního koncentrátu na 1 L roztoku) a semenáčky do víka vany upevníme pomocí měkkých zátek po dvou do každého otvoru. Vany umístíme do klimaboxu při teplotě 20°C a fotoperiodě 16 h. Pět až sedm dní před předpokládaným měřením přeneseme polovinu rostlin do nové vany naplněné roztokem obsahujícím všechny živiny kromě dusíku.
3. Před vlastním měřením připravíme v klimaboxu PE lahvičky se vzduchovaným živným roztokem. Podle typu roztoku a předpůsobení rostliny rozdělíme rostliny na dvě varianty s pěti úrovněmi dusíku (3 opakování ve variantě):
 - a) živný roztok s dusíkem pouze ve formě nitrátových iontů (*indukované* rostliny) v koncentracích 0,1 – 0,2 – 0,5 – 1 – 5 mM
 - b) živný roztok s dusíkem pouze ve formě nitrátových iontů (*neindukované* rostliny) ve stejných koncentracích jako v bodě a)Živný roztok bude mít stejné složení, jako ten, ve kterém byly pěstovány indukované rostliny (Hoaglandův roztok), lišit se bude pouze koncentrací nitrátů.
4. Všechny roztoky připravíme v dostatečném množství a jejich pH nastavíme na 6,0.
5. Asi hodinu před začátkem inkubace rostliny opatrně přeneseme z kultivačních van do expozičních nádobek naplněných stejným roztokem, jako byl v kultivačních vanách, abychom omezili vliv stresu z manipulace s rostlinami na rychlost příjmu.
6. Na začátku měření rychlostí příjmu (inkubace) z každé z lahviček odsajeme opatrně všechn živný roztok a lahvičku naplníme příslušným čerstvým roztokem podle typu varianty. Odměříme přesně 200 ml roztoku a znovu upevníme rostliny. S rostlinami manipulujeme velmi opatrně a zejména se snažíme co nejméně dotýkat kořenů.
7. Zbytky připravených roztoků použijeme na stanovení počáteční koncentrace nitrátových iontů.
8. Od okamžiku zasazení rostlin do roztoku měříme délku expozice rostlin (s přesností na minuty), která by měla být v rozmezí 1 - 3 hodiny, podle koncentrace nitrátu ve sledovaném roztoku – menší koncentrace – kratší inkubace.
9. Na konci měření vyndáme rostliny z lahviček. Z kořenů při tom opatrně okapeme živný roztok zpátky do lahvičky.
10. Změříme koncový objem živného roztoku v nádobce pomocí odměrného válce a roztok uschováme v uzavřené lahvičce pro stanovení koncové koncentrace nitrátů. Vzorky uchováváme v mrazničce.
11. Kořeny měřených rostlin osušíme buničitou vatou, oddělíme od nadzemní části a zvážíme jejich čerstvou hmotnost. Potom je vložíme do označeného sáčku a usušíme při 80°C 24 h.
12. Koncentraci nitrátů v roztoku stanovíme buď pomocí ISE nebo spektrofotometricky.

13. Rychlost čistého příjmu potom vypočítáme pro každou lahvičku zvlášť podle níže uvedeného vzorce a vztáhneme ji jak na čerstvou hmotnost, tak i na sušinu kořenů. Při výpočtu látkového množství NO_3^- musíme brát v úvahu jak změnu koncentrace, tak i změnu objemu v průběhu expozice rostlin!

$$\text{NUR} = [n(\text{NO}_3^-)_1 - n(\text{NO}_3^-)_2] / (m * t) \quad [\mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}]$$

NUR - rychlost čistého příjmu

$n(\text{NO}_3^-)_1, n(\text{NO}_3^-)_2$ - látkové množství NO_3^- v lahvičce na začátku a na konci expozice (μmol)

m – hmotnost kořenů v lahvičce (g)

t – časový interval, po který byly rostliny exponovány (h)

14. Vypočtete průměrné rychlosti příjmu pro každou koncentraci NO_3^- a pokusnou variantu a zapište do tabulky s naměřenými daty. Zjištěné průměrné rychlosti vynesete do grafu v závislosti na koncentraci nitrátových iontů v roztoku.

Měření koncentrace nitrátových iontů v roztoku

Kolorimetrické stanovení

Tento způsob analýzy je výhodný zejména pokud potřebujeme přesně analyzovat roztoky s nízkou koncentrací NO_3^- nebo máme-li k dispozici pouze malé množství vzorku.

1. Připravíme čerstvá reakční činidla. Činidlo A - 5 g k. salicylové rozpustíme v 96% H_2SO_4 a doplníme na 100 ml 96% k. sírovou. Činidlo B - rozpustíme 40 g NaOH v dest. vodě a doplníme na 500 ml dest. vodou.
2. Připravíme kalibrační řadu z koncentrátu (0,0680 g NaNO_3 rozpustíme ve 100 ml dest. vody = 8mM) ředíme na 0 - 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 -6,0 mM do 50 ml odměrek.
3. Provedeme reakci v označených 1,5 ml mikrozkušavkách : 40 μl činidla A přidáme k 10 μl vzorku nebo standardu, promícháme, rychle centrifugujeme (cca 20 sec.) a necháme inkubovat 20 min. při pokojové teplotě. Potom přidáme 1 ml činidla B, promícháme a necháme vychladnout na pokojovou teplotu. Absorbanci vzorků měříme při 410 nm.