

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

Hodnocení vlivu indukce na rychlost příjmu, sledování kinetiky příjmu

1. Obilky kukuřice 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 koncentráту 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 šesti 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 - 2 - 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 (pomocí hadičky napojené na vývěvu s rezervoárem) opatrně všechny živný roztok a lahvičku naplníme příslušným čerstvým roztokem podle typu varianty. Odměříme přesně objem inkubačního živného 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 uchováme 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 vyneste 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.