

## Měření rychlosti čistého příjmu nitrátu sledováním úbytku $\text{NO}_3^-$ 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 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 jiné kultivační vany naplněné roztokem obsahujícím všechny živiny kromě dusíku (= *neindukované rostliny*) a u druhé poloviny rostlin pouze vyměníme původní roztok s obsahem dusíku za čerstvý o stejném složení (= *indukované rostliny*).
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 ve formě nitrátových iontů (*indukované rostliny*)  
v koncentracích: 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1 - 2 - 5 mM
  - b) živný roztok s dusíkem 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 všechn 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. Vzoroky 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  $\text{NO}_3^-$  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  $\text{NO}_3^-$  v lahvičce na začátku a na konci expozice ( $\mu\text{mol}$ )

$m$  – hmotnost kořenů v lahvičce (g)

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

14. Vypočtete průměrné rychlosti příjmu pro každou koncentraci  $\text{NO}_3^-$  a pokusnou variantu a запиšte 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  $\text{NO}_3^-$  nebo máme-li k dispozici pouze malé množství vzorku.

1. Připravíme čerstvá reakční činidla. *Činidlo A* - 5 g k. salicylové rozpustíme v 96%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  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  $\text{NaNO}_3$  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  $\mu\text{l}$  činidla **A** přidáme k 10  $\mu\text{l}$  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.