

## Koloběh dusíku

### Cíle

Seznámení s problematikou koloběhu dusíku. Stanovení obsahu dusičnanů a amonných iontů jako indikátorů znečištění vodních zdrojů.

### Zadání úlohy

Seznamte se se základním pohledem na koloběh dusíku. Stanovte koncentraci dusíkatých látek v několika vzorcích povrchové vody.

### Pomůcky

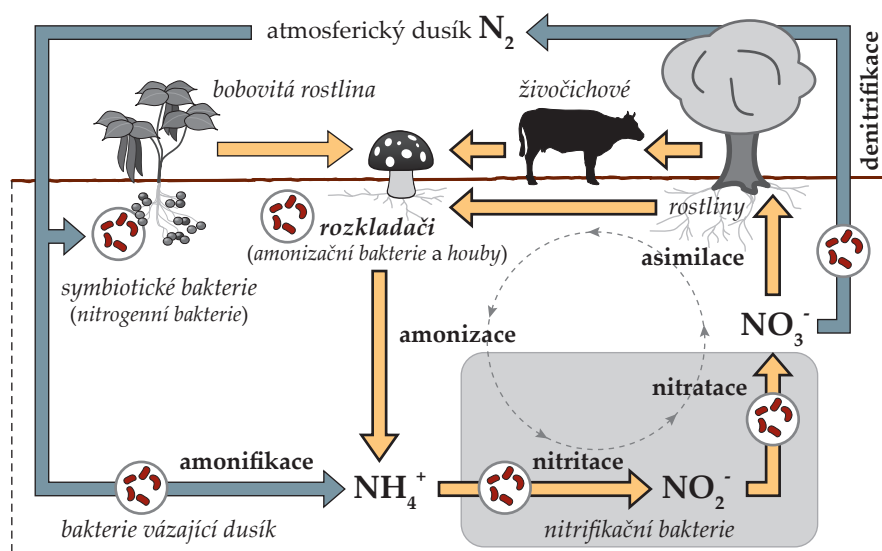
PASCO ISE:  $\text{NO}_3^-$  (CI-6735),  $\text{NH}_4^+$  (CI-6717), PASCO rozhraní pro připojení elektrody s teplotním čidlem (PS-2147), datalogger PASCO SPARK či Xplorer GLX, popř. USBlink a počítač se SW SPARKvue, odměrný válec 50 ml, pipeta (1–10 ml), mikropipeta (100  $\mu\text{l}$ ), kádinka 150 ml, kádinka 400 ml na odpad, odměrná baňka 100 ml (4 $\times$ ), odměrná baňka 50 ml, stojan, svorka pro uchycení elektrody, buničitá vata, stříčka s destilovanou vodou, chemikálie (dest. voda, 0,1 M  $\text{NaNO}_3$  (8,7 g na 1 l), 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (264 g na 1 l), 0,1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5,34 g na 1 l), 4 M KCl (298 g na 1 l)), několik vzorků vody (ideálně tři vzorky: potok před obcí, potok za obcí, rybník, popř. „kohoutková voda“), popisovač (lihový fix), pracovní návod, pracovní list

### Teoretický úvod

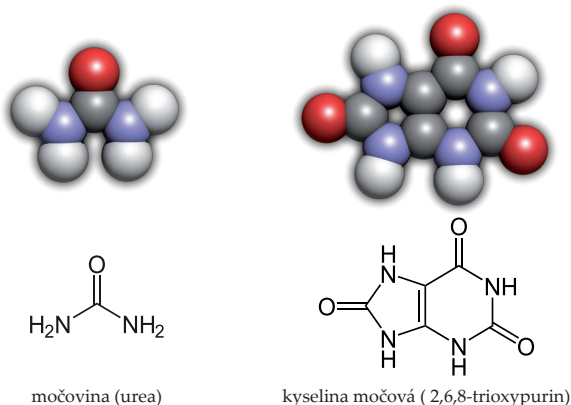
Dusík je nedílnou součástí **živých organizmů**. Některé organizmy, jako např. **rostliny**, dokáží využívat anorganickou formu dusíku, jiné potřebují dusík vázaný ve sloučeninách organických. U všech ale

nakonec najdeme dusík vázaný v aminokyselinách, což jsou základní stavební kameny **bílkovin** neboli **proteinů**. Vedle proteinů se dusík vyskytuje v celé řadě dalších, pro život nezbytných, organických sloučeninách. Za všechny jmenujme alespoň **nukleové kyseliny, vitamíny a hormony**.

Pojďme se nyní podívat, v jakých anorganických sloučeninách se dusík v přírodě vyskytuje a jak ho živé organizmy získávají. Přeměna dusíku a jeho sloučenin v přírodě kolem

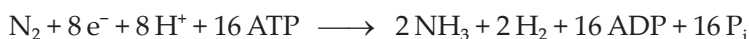


Obr. 1: Schéma koloběhu dusíku



Obr. 2: Modely a strukturální vzorce dusíkatých odpadních metabolitů

některých rostlin (např. z čeledi bobovitých). Bakterie jsou u těchto rostlin často ve speciálních kořenových hlízkách. Proto se někdy označují jako **hlízkové bakterie** (např. rod *Rhizobium*). Řada těchto bakterií ale žije v půdě samostatně bez symbiotického vztahu s vyššími rostlinami. Tyto bakterie mají speciální enzym, **nitrogenázu**, který je schopný redukovat atmosferický dusík na amoniak, resp. **amonný kationt**. K reakci je třeba energie z ATP. Souhrnně můžeme reakci zapsat:



$\text{P}_i$  – fosforečnanový aniont (fosfát) uvolněný při štěpení ATP

Takovýto způsob biologické fixace dusíku se označuje jako **diazotrofie**.

Amoniak je pro živé organizmy ve vyšších koncentracích toxický, a tak je nejčastěji co nejdříve spotřebován při stavbě aminokyselin, nebo vyloučen do okolního prostředí. Amoniak ale může mít původ také v rozkladu odumřelých těl živých organismů, při kterém se uplatní nejen **amonizační bakterie**, ale také **houby** (rozkladači).

Pokud se amoniak dostane do půdy, zpracovávají ho dále tzv. **nitrifikační bakterie** (např. rody *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* a *Nitrospira*). Ty nejdříve zoxidují amonný iont na iont **dusitanový** ( $\text{NO}_2^-$ ) a v dalším kroku až na **dusičnanový** ( $\text{NO}_3^-$ ). Při této reakci vznikají také ionty  $\text{H}^+$ , a tak dochází k **okyselení půdy**. Dusičnany pak jsou schopny využít jako zdroj dusíku především rostliny (a díky nim zprostředkovaně i živočichové), nebo je další specializovaný typ organismů přemění zpět na plynný dusík ( $\text{N}_2$ ) – tzv. **biologická denitrifikace** (např. bakterie rodu *Pseudomonas*). Tím je koloběh dusíku uzavřen.

Víme již, jakou cestou se mohou do půdy, a tím pádem i do vody, dostat amonné a dusičnanové ionty. Nesmíme ale zapomenout ani na „umělé“ vnášení těchto látek do prostředí, především v rámci hnojení. Přehnožování je významným faktorem, který v důsledku vede ke zvýšení koncentrace dusíkatých látek jak v povrchových, tak v podzemních vodách. Nejen, že jsou pro nás tyto látky toxické, ale navíc hrají významnou roli při procesu **eutrofizace**. Důsledkem nadměrného množství živin v povrchových vodách je pak přemnožení planktonu (vodní květ) a posléze masové vymírání všeho živého na základě nedostatku kyslíku (popř. působením toxických látek produkovaných přemnoženými sinicemi).

V našem experimentu použijeme ke stanovení inkriminovaných iontů **iontově selektivní elektrody (ISE)**.

Iontově selektivní elektrody jsou takové elektrody, které jsou citlivé na ionty a jsou více či méně selektivní pro jejich určité druhy. Většina jich je založena na vzniku **membránového potenciálu**. Princip konstrukce a funkce těchto elektrod si přiblížíme s využitím **obr. 4**.

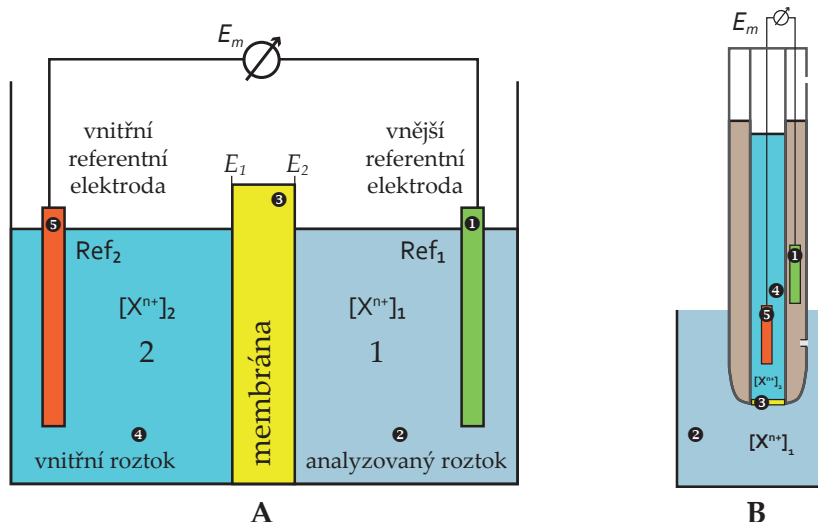
Když od sebe oddělíme **dva roztoky 1 a 2**, obsahující ionty o různé koncentraci, pórovitou přepážkou (membránou), budou ionty touto přepážkou procházet z jednoho roztoku do druhého tak, aby se pro všechny ionty postupně ustavila rovnováha a roztoky přitom

nás se označuje jako tzv. **biogeochemický cyklus dusíku**. Někdy o něm hovoříme také jako o „koloběhu dusíku“ (obr. 1).

Na schématu je vidět, že dusík je v rámci koloběhu dusíku vázán pouze v několika málo **anorganických sloučeninách**. Je to především **dusičnanový aniont** a **amonný kationt**.

Z **organických sloučenin** jsou to pak dusíkaté odpadní metabolity jako **močovina** a **kyselina močová** (obr. 2). Důležitou roli hrají samozřejmě aminokyseliny jako stavební jednotky proteinů.

Atmosferický dusík (78 % v atmosféře) jsou schopny vázat některé symbiotické bakterie (např. rod *Azotobacter*), které žijí v kořenovém systému



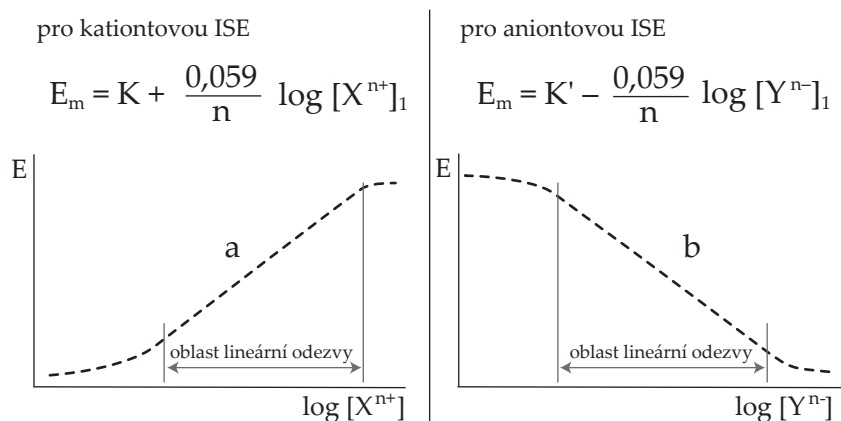
Obr. 4: Schéma konstrukce iontově selektivní elektrody (ISE). Schematické znázornění (A) následuje možné provedení kombinované elektrody (B).

zůstaly elektroneutrální. Protože rychlost průchodu různých iontů přepážkou je různá, na přepážce se vytvoří potenciálový spád. Mezi rozhraními s roztoky 1 a 2 vznikne potenciálový rozdíl zvaný **membránový potenciál**. Když je membrána polopropustná, tj. mohou-li skrze ni procházet jen některé druhy iontů, nazývá se vzniklý potenciálový rozdíl **Donnanův potenciál**.

Pokud bychom měli v ideálním případě membránu propustnou jen pro jediný druh iontů, odpovídal by **potenciálový**

**rozdíl poměru koncentrací** tohoto iontu v roztocích 1 a 2. V takovém případě by se při známé koncentraci v roztoku 2 mohla změřením membránového potenciálu specificky stanovit koncentrace v roztoku 1. Jsou-li koncentrace iontu na obou stranách membrány stejné, jsou stejné i potenciály  $E_1$  a  $E_2$  a  $E_m = 0$ .

V ISE je vždy jedna strana membrány v kontaktu s referentním (vnitřním) roztokem o konstantní koncentraci stanovovaného iontu, v němž je ponořena vnitřní referentní elektroda. Druhá strana membrány je v kontaktu s analyzovaným roztokem se stanovovanou koncentrací, v němž je ponořena vnější referentní elektroda. Pro iont pak platí, že:



Obr. 5: Vztah pro výpočet membránového potenciálu ( $E_m$ ) u kationtové a aniontové ISE ( $K, K'$  – konstanty,  $[X]$  – koncentrace sledovaného iontu,  $n$  – náboj). U kationtové ISE s rostoucí koncentrací potenciál roste (a), u aniontové ISE naopak klesá (b).

Závislost potenciálu na logaritmu koncentrace bývá lineární přes několik koncentračních řádů (typicky asi od  $10^{-5}$  do  $10^{-1}$  mol/l), analyticky lze ISE využít pro stanovení iontů typicky v koncentracích od asi  $10^{-6}$  do 1 mol/l.

V praxi ovšem do naší teorie vstupuje řada faktorů, které výsledný změřený potenciál ovlivňují. Některé je možné eliminovat pouze tzv. **kalibrační elektrody**, kdy proměříme potenciály roztoků o známé koncentraci sledovaného iontu. Jiné, jako třeba **interferující ionty**, na které elektroda také reaguje, je třeba z měřeného roztoku předem odstranit nebo maskovat.

## Bezpečnost práce

Pracujte pečlivě a v souladu s pracovním návodem. Dbejte zvýšené opatrnosti a s chemikáliemi zacházejte vždy v souladu s instrukcemi na obalu. Nikdy nepipetujte ústy. V laboratoři používejte ochranné brýle, plášť, a případně další pomůcky v souladu se správnou laboratorní praxí.

NaNO<sub>3</sub> (Xi, R 8-36)

NH<sub>4</sub>Cl (Xn, R 22-36, S 22)

## Příprava úlohy

Úloha umožňuje pracovat paralelně na několika částech. Pokud pracují žáci s ISE poprvé, je vhodné ponechat jednu skupinu pracovat pouze s jednou elektrodou. Jedna ze skupin bude zjišťovat koncentraci dusičnanových iontů, druhá skupina koncentraci iontů amonných. Ideální jsou tříčlenné pracovní skupiny. První žák pracuje na bodu č. 1 – **Příprava kalibračních roztoků**. Druhý žák připraví **roztok pro úpravu iontové síly** – bod č. 2. Třetí žák se věnuje problematice **zapojení HW a nastavení SW** – bod č. 3. Další body (4, 5 a 6) realizují žáci společně.

## Postup práce

Snažte se pracovat co nejpřesněji. Velice důležitá je čistota chemického nádobí.

Úlohu můžeme rozdělit do několika kroků:

### A) Práce s dusičnanovou ISE (stanovení koncentrace dusičnanů)

#### 1) Příprava kalibračních roztoků

- a) Připravte si čtyři 100 ml odměrné baňky a označte si je čísly 1–4. Postupně do jednotlivých baněk napipetujte následující objemy 0,1 M zásobního roztoku NaNO<sub>3</sub> a baňky č. 1–3 doplňte do 100 ml (**po rysku**) **destilovanou vodou**:

Odm. baňka č.	4	3	2	1
Výsledná koncentrace NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mol/l]	0,1	0,01	0,001	0,0001
V (zás. roztok) [ml]	100	10	1	0,1
Doplnění dest. H <sub>2</sub> O po rysku [ml]	Pracujte přímo se 100 ml zásobního roztoku	Doplňte dest. H <sub>2</sub> O po rysku.		

#### 2) Příprava roztoku pro úpravu iontové síly (ISA)

- a) Pro úpravu iontové síly všech měřených roztoků budete potřebovat roztok 2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Spočítejte, jakou hmotnost (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> budete potřebovat k přípravě 50 ml 2 M roztoku, je-li M((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = 132,14 g/mol.

- b) Připravte výše uvedený roztok. (K jeho přípravě použijte 50 ml odměrnou baňku.)

#### 3) Zapojení elektrody a nastavení

- a) Ověřte si u vyučujícího, že je vaše elektroda připravena k použití. (Musí být řádně naplněna plnicím roztokem, nikde na rozhraní nesmí být bublinky, membrána ve spodní části nesmí být viditelně poškozená.)

- b) Přejděte na část návodu „Nastavení HW a SW“.

#### 4) Proměření kalibračních roztoků a vzorku povrchové vody

- a) Přejděte na následující část „Vlastní měření“.

#### 5) Sestavení kalibrační přímky a výpočet neznámé koncentrace



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## B) Práce s amonnou ISE (stanovení koncentrace amonných iontů)

### 1) Příprava kalibračních roztoků

- a) Připravte si čtyři 100 ml odměrné baňky a označte si je čísly 1–4. Postupně do jednotlivých baněk napipetujte následující objemy 0,1 M zásobního roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a baňky č. 1–3 doplňte do 100 ml (po rysku) destilovanou vodou:

Odm. baňka č.	4	3	2	1
Výsledná koncentrace $\text{NH}_4^+$ [mol/l]	0,1	0,01	0,001	0,0001
V (zás. roztok) [ml]	100	10	1	0,1
Doplnění dest. $\text{H}_2\text{O}$ po rysku [ml]	Pracujte přímo se 100 ml zásobního roztoku		Doplňte dest. $\text{H}_2\text{O}$ po rysku.	

### 2) Příprava roztoku pro úpravu iontové síly (ISA)

- a) Pro úpravu iontové síly všech měřených roztoků budete potřebovat roztok 4 M KCl. Spočítejte, jakou hmotnost KCl budete potřebovat k přípravě 50 ml 4 M roztoku, je-li  $M(\text{KCl}) = 74,6 \text{ g/mol}$ .
- b) Připravte výše uvedený roztok. (K jeho přípravě použijte 50 ml odměrnou baňku.)

### 3) Zapojení elektrody a nastavení

- a) Ověřte si u vyučujícího, že je vaše elektroda připravena k použití. (Musí být řádně naplněna plnicím roztokem, nikde na rozhraní nesmí být bublinky, membrána ve spodní části nesmí být viditelně poškozená.)
- b) Přejděte na část návodu „Nastavení HW a SW“.

### 4) Proměření kalibračních roztoků a vzorku povrchové vody

- a) Přejděte na následující část „Vlastní měření“.

### 5) Sestavení kalibrační přímky a výpočet neznámé koncentrace

## Nastavení HW a SW



Obr. 6: Sestavená aparatura a připravené roztoky na pracovním místě

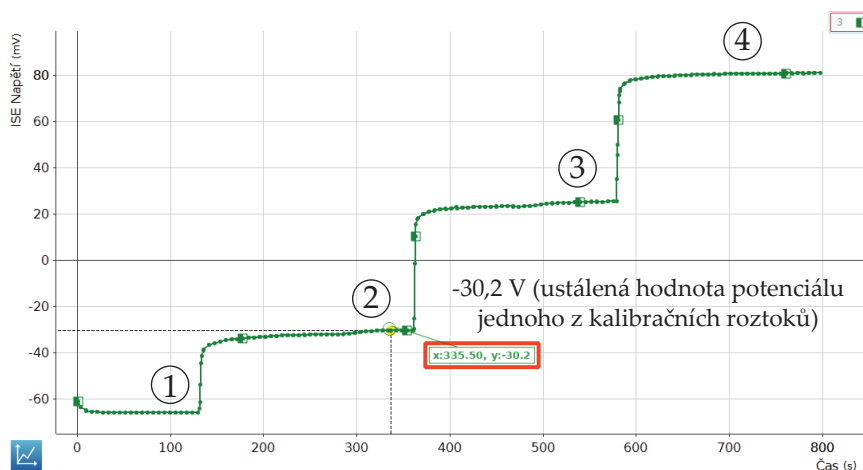


Obr. 7: Detail připojení elektrody

- 1) S dataloggerem PASCO SPARK propojte rozhraní pro připojení elektrody („Precision pH and Temperature plus ORP/ISE Amplifier“, PS-2147).
- 2) Pomocí BNC konektoru připojte elektrodu. Po nasunutí konektoru pootočením objímky konektor zajistěte (obr. 7).
- 3) Na dataloggeru SPARK si otevřete soubor **ch03-kolobeh\_N-NO3.spk** nebo **ch09-kolobeh\_N-NH4.spk** podle toho, se kterou elektrodou budete pracovat.

## Vlastní měření a záznam dat

- 1) Spusťte měření kliknutím na tlačítko *Start*. (Protože zaznamenáváme časový průběh v mV do grafu, můžeme spustit měření již nyní a vypnout ho až v úplném závěru této části.)
- 2) Vyměňte elektrodu ze skladovacího roztoku.
- 3) Měření začněte s kalibračním roztokem o nejnižší koncentraci (roztok č. 1).
- 4) Do čisté 150 ml kádinky přelijte kalibrační roztok a přidejte 2 ml roztoku pro úpravu iontové síly (ISA).
- 5) Pečlivě elektrodu opláchněte destilovanou vodou. Tělo elektrody, nikoli však membránu dole (!), osušte kouskem buničité vaty.
- 6) Ponořte elektrodu do kalibračního roztoku tak, aby se nedotýkala dna (Pozor na poškození membrány!). Lehce elektrodou roztok promíchejte, a pak ji upněte do držáku. Zkontrolujte, zda na membráně nezůstaly bublinky – pokud ano, lehce elektrodou znovu roztok promíchejte. Následně vyčkejte ustálení měřené hodnoty.
- 7) Po ustálení hodnoty si přímo v dataloggeru, v pravé dolní části, naměřený potenciál poznamenejte. (Nepřerušujte přitom záznam dat, ten je stále spuštěn.)
- 8) Vyměňte elektrodu z roztoku a postup od bodu č. 4 zopakujte postupně s kalibračními roztoky 2, 3, 4.
- 9) Nepřerušujte záznam měření. Všechny hodnoty tak budou zaznamenány v jednom grafu (viz obr. 8).



Obr. 8: Ukázka časového záznamu z průběhu kalibrace ISE. Každý „skok“ odpovídá jednomu kalibračnímu roztoku (1-4).

- 10) Obdobným způsobem změřte postupně **vzorky povrchové vody**. (V případě hrubých nečistot či řas a sinic ve vodě je nutné vodu předem přefiltrovat!)
  - a) Do čisté kádinky odměřte ve válci 50 ml vzorku povrchové vody a přidejte 1 ml roztoku ISA. (Oproti kalibraci pracujeme s polovičním množstvím.)
  - b) Vyčkejte ustálení hodnoty a poznamenejte si ji do **tabulky v pracovním listě**. Vyměňte elektrodu z roztoku, opláchněte ji a osušte.
  - c) Postup opakujte s dalším vzorkem povrchové vody. Nezapomeňte si poznamennat, v jakém pořadí jste neznámé vzorky povrchových vod proměřovali.
  - d) Pokud vám zbývá dostatek času, proveďte ještě stejný postup s „kohoutkovou vodou“ ve vaší laboratoři.
  - e) Všechna měření je dobré provést alespoň dvakrát.
- 11) Na dataloggeru PASCO SPARK stiskněte tlačítko *Stop*.
- 12) Soubor, ve kterém jsou všechna provedená měření, si uložte pod vlastním názvem pro další analýzu a případný tisk protokolu.

## Analýza naměřených dat

- Již v průběhu jednotlivých měření jste si zaznamenávali jednotlivé ustálené hodnoty. Nyní sestavte z naměřených hodnot u roztoků o známé koncentraci (kalibrační roztoky) kalibrační přímkou.
- Následně z kalibrační přímky dopočítejte koncentrace v odebraných vzorcích povrchové vody, a případně v „kohoutkové vodě“.
- K sestavení kalibrační přímky a výpočtům koncentrací je vhodné využít soubor **ch09-kolobehN-kalibrace\_a\_vypocty.xlsx**. (Soubor je dostupný na portálu [www.expoz.cz](http://www.expoz.cz).)

## Informační zdroje

- [http://en.wikipedia.org/wiki/Nitrogen\\_cycle](http://en.wikipedia.org/wiki/Nitrogen_cycle)
- PROCHÁZKA, Stanislav a Klaus-Heinrich RÖHM. *Fyziologie rostlin*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1998, 484 s. Thieme flexibook. ISBN 80-200-0586-2.
- [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Ionty\\_v\\_pitn%C3%A9\\_vod%C4%9B](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Ionty_v_pitn%C3%A9_vod%C4%9B)
- GREENWOOD, N a Alan EARNSHAW. *Chemie proků*. 1. vyd. Praha: Informatorium, 1993. ISBN 80-85427-38-9.
- Vyhláška č. 252/2004 Sb  
(dostupná např. na adrese <http://www.tzb-info.cz/pravni-predpisy/vyhlaska-c-252-2004-sb-kterou-se-stanovi-hygienicke-pozadavky-na-pitnou-a-teplou-vodu-a-cetnost-a-rozsah-kontroly-pitne-vody>)



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ