

Gazometrie – výměna kyslíku

Uvažujeme-li obecně o výměně kyslíku (O_2) jako součásti gazometrie v rámci rostlinné fyziologie, máme na mysli v první řadě fotosyntetický výdej a respirační spotřebu O_2 . Oba tyto procesy slouží jako generátory energetických (adenosintrifosfát, ATP) a redukčních (nikotinamidadenindinukleotid a nikotinamidadenindinukleotidfosfát, NADH a NADPH) ekvivalentů využívaných pro růst a vývoj rostlin. Při fotosyntéze se energie získává z absorbovaného viditelného záření jeho transformací fotosyntetickými strukturami asimilačního aparátu. Měření fotosyntetického výdeje O_2 je doplňkovým přístupem k měření asimilace CO_2 . Obě metody spolu v rámci fotosyntézy korelují.

U suchozemských rostlin je výhodnější měřit fotosyntézu a dýchání jako výměnu CO_2 v plynném prostředí, protože se současnou přístrojovou technikou jsou měření dostatečně přesná a spolehlivá. Navíc v případě výměny O_2 by malé změny obsahu O_2 dané fotosyntézou byly obtížně měřitelné na pozadí vysoké koncentrace O_2 ve vzduchu. Pro vodní rostliny a řasy je naopak výhodnější měřit výměnu O_2 . Hlavním důvodem je fakt, že rozpustnost CO_2 ve vodě je nízká a koncentraci ještě snižuje přeměna části jeho molekul na hydrogenuhličitanové (HCO_3^-) a uhličitánové (CO_3^{2-}) ionty a na molekuly kyseliny uhličitě (H_2CO_3). K výhodnosti použití výměny O_2 v tomto případě přispívá dále poznatek, že ve vodném prostředí je difuze plynů pomalejší, a tím i místní změny množství O_2 výraznější.

Jen pro připomenutí, k vývoji O_2 dochází v chloroplastech s využitím absorbované energie záření při rozkladu molekul vody (H_2O) na manganovém komplexu u fotosystému II, jenž je součástí tylakoidních membrán. Přitom dojde k separaci záporného náboje (elektronu). Takto transformovaná energie je využita pro vznik ATP a NADPH a k následné asimilaci CO_2 . Kyslík se z fotosyntetizujícího pletiva uvolňuje do okolí vlastně jako odpadní produkt vznikající při transformaci přijaté energie na konci fotofyzikální části fotosyntézy. Z bilanční rovnice fotosyntézy $CO_2 + H_2O \rightarrow [CH_2O] + O_2$, kde $[CH_2O]$ představuje strukturální jednotku cukrů, vychází teoretický kvantitativní vztah mezi vzniklým O_2 a spotřebovaným CO_2 na 1 mol (O_2) / mol (CO_2). Ve skutečnosti je však zapotřebí rozložit více molekul H_2O z důvodu existence fotorespirace (viz dále v textu) v běžné atmosféře obsahující O_2 , ale také kvůli vyšší energetické náročnosti fixace CO_2 , než je ta teoretická. Za reálných podmínek se tedy vzájemný molární poměr mezi uvolňovaným O_2 a spotřebovaným CO_2 pohybuje v rozmezí 1,3–2,0.

Ke spotřebě O_2 respirací dochází, když energetický obsah dopadajícího záření nedostačuje k tomu, aby mohl pohánět celou fotosyntetickou „mašinerii“ a samozřejmě naplno se uplatní ve tmě. Proto se nazývá

temnostní respirace. Má charakter standardní mitochondriální respirace, jak je známa u heterotrofních organismů. Aniž by podle teoretických úvah musela, temnostní respirace, tedy mitochondriální proces, pokračuje i po celou dobu světelné periody a odtud pochází i její název – denní respirace. Není snadné ji měřit, často se jen odhaduje. Má se za to, že její nejvyšší hodnota nemůže přesahovat temnostní respiraci. Nejnižší hodnota bývá zpravidla ztotožňována s polovinou hodnoty respirace ve tmě.

Během světelné periody ve standardní kyslíkové atmosféře probíhá u vyšších rostlin, některých druhů řas a sinic ještě jedna nevyhnutelná spotřeba O_2 – fotorespirace. Tento cyklický pochod, zahrnující u eukaryot několik buněčných organel, má počátek v chloroplastech v oxygenaci ribulóza-1,5-bisfosfátu (RuBP), konkurenčním procesu ke karboxylaci tohoto substrátu. Na fotorespiraci se kromě chloroplastů podílejí peroxizomy a mitochondrie. Během fotorespirace dochází ke ztrátě CO_2 . Cyklus se uzavírá v chloroplastech, kde se zbylý meziprodukt (fosfoglycerát) zapojuje zpět do asimilačního procesu.

Ještě je třeba se pro úplnost zmínit o jednom ději spojeném se spotřebou O_2 a souvisejícím s fotosyntézou. Jde o pseudocyklický transport elektronů (Mehlerovu reakci), při němž se elektron putující transportním řetězcem na úrovni fotosystému I přeneseme na molekulu O_2 za vzniku superoxidového radikálu O_2^- . Tento jev se však v gazometrii nijak neprojevuje, a nelze jej tudíž ani žádnou gazometrickou metodou měřit.

Kyslíková komůrka

Přístroj pro měření výměny kyslíku v laboratorních podmínkách se nazývá kyslíková komůrka. V laboratorním provedení je to malý stolní přístroj. Principiálně lze jeho prostřednictvím měřit výdej i spotřebu kyslíku, a to na objektech rostlinného i živočišného původu. Existují komůrky jak pro pevné vzorky (listové pletivo, části živočišných tkání), tak pro vzorky měřené v kapalně fázi – protoplasty, izolované buněčné organely, řasy, sinice. Dvě taková zařízení pro práci s pevnými vzorky (např. kousky

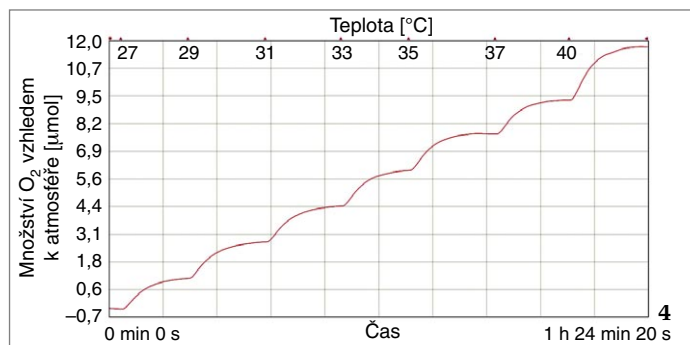


1 až 3 Listová disková komůrka Hansatech LD2/3 pro měření výměny kyslíku (O_2) u pevných vzorků (obr. 1). Komůrka Hansatech DW2/2 pro měření rozpuštěného O_2 v kapalně fázi (2) a kyslíkový elektrodový disk (3). Detektor je tvořen plastovým tělem diskovitého tvaru (z umělého materiálu pryskyřice) s platinovou katodou na vrcholu malé kopulky a stříbrnou anodou tvaru mezikruží ve žlábků u její paty. Na horní straně v mělkém vybrání je těsnicí o-kroužek a ve spodní části kopulky v zářezu menší o-kroužek pro fixaci tenké plastové membrány přetahující se přes kopulku. Z boční strany vystupuje elektrický konektor pro připojení propojovacího kabelu.

listů, obr. 1) a kapalnými vzorky (obr. 2) vyrábí firma Hansatech Instruments z Velké Británie. V tomto textu bude pojednáno především o výměně O_2 pevnými vzorky (listovými a jinými pletivy) s využitím listové diskové komůrky. Poprvé byla zmínka o tomto přístroji uvedena v publikaci T. Delieu a D. A. Walkera (1981).

• Detektor kyslíku

Společnou částí uvedených typů komůrek je elektrochemický detektor O_2 . Vyvinul ho Leland C. Clark (1956). Tento detektor má výhodu, že může pracovat v různých prostředích – v suchém i vlhkém vzduchu, ale také přímo ve vodě. Většinou se tomuto čidlu jednoduše, ale nesprávně říká kyslíková elektroda (i když jeho součástí není jen jedna elektroda, ale samozřejmě elektrody dvě – katoda a anoda), správně kyslíkové amperometrické čidlo. Jak už název napovídá, elektrická odezva (proud) detektoru



je přímo úměrná množství O₂ v jeho okolí. Technické provedení může být různorodé, všechny typy však mají jedno společné – materiál elektrod. Katoda je platinová (Pt) a má většinou tvar kruhového plíšku, anoda je stříbrná (Ag) a podle použití v konkrétním čidle může mít tvar např. spirály nebo mezikruží (obr. 3). Detektor se připojuje k řídicímu elektronickému členu, který poskytuje potřebné napětí pro elektrody, mění výstupní elektrický proud generovaný elektrodami na napětí a to následně digitalizuje. Řídicí člen je připojen k počítači, kde je digitalizovaný signál zpracováván speciálním programem (OxyTrace+).

● Příprava čidla k měření

Takto popsaný detektor ještě není schopen měření, musí být k němu nejprve připraven. Příprava spočívá v přetažení tenké umělohmotné membrány smáčitelné vodnými roztoky (teflonové nebo polyetylenové fólie) přes kopulku s katodou a jejím zafixováním pryžovým o-kroužkem ve spodní části kopulky. Do žlábků v těle detektoru se nalije (napipetuje) vhodný elektrolyt (viz dále), který nasákne do membrány a zajistí vodivé elektrické propojení katody a anody. Výrobce ještě doporučuje umístění kousku tenkého papíru (nejlépe cigaretového) pod membránu k dosažení co možná nejrovnoměrnosti vrstvy elektrolytu. Membrána je propustná pro molekuly O₂. Elektroda se při vložení vnějšího napětí polarizuje, při 600–700 mV je O₂ na katodě redukován elektrony a vstupuje do reakcí se složkami elektrolytu – dochází k elektrolýze.

Existuje mnoho druhů a variací elektrolýtů. Mohou být jednoduchého složení nebo vícesložkové. Jedno snad mají společné – obsahují chlorid draselný (KCl). Elektrolyty se liší také podle toho, pro jaký účel má detektor sloužit, zda pro komůrky na měření pevných, nebo kapalných vzorků. Vícesložkový elektrolyt, který se často používá s listovou diskovou komůrkou, má např. složení: 200mM KCl, 66mM hydrogenfosforečnan sodný (Na₂HPO₄), 600mM dusičnan draselný (KNO₃) a 70mM hydroxid sodný (NaOH); pH se nastaví na 11,2 (pomocí kyseliny chlorovodíkové, HCl). Elektrolyty pro komůrky na měření v kapalně fázi bývají jednodušší s hlavní složkou 0,1M až 1M roztokem KCl nebo chloridu sodného (NaCl). Někdy se do elektrolytu přidává ještě etylenglykol pro znesnadnění jeho vysychání v průběhu používání elektrody. Většina elektrolytů je stabilní, nerozkládá se a jejich zmrazené zásobní roztoky vydrží řadu let.

● Chemické reakce v elektrolytu

Chemismus reakcí lze popsat následujícími rovnicemi. Katoda poskytuje elektrony k redukci O₂: $O_2 + 2 e^- + 2 H_2O \rightarrow H_2O_2 + 2 OH^-$; $H_2O_2 + 2 e^- \rightarrow 2 OH^-$.

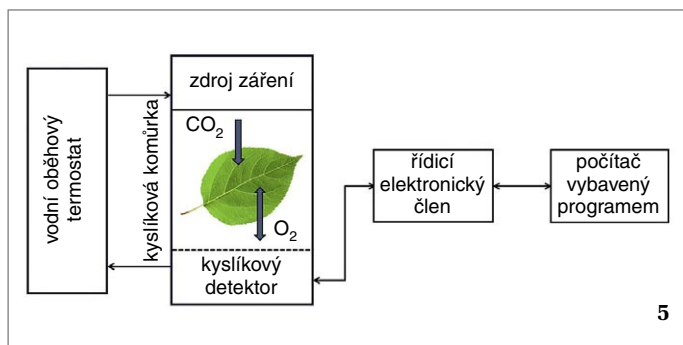
Na anodě probíhá reakce (s přihlédnutím k zákonu zachování náboje): $4 Ag \rightarrow 4 Ag^+ + 4 e^-$; $4 Ag^+ + 4 OH^- \rightarrow 4 AgOH$; $2 AgOH \rightarrow H_2O + Ag_2O \downarrow$ (černohnědá sraženina při použití vícesložkového elektrolytu); $4 Ag^+ + 4 Cl^- \rightarrow 4 AgCl \downarrow$ (bílá sraženina při použití elektrolytu s KCl).

● Regenerace anody

Zatímco Pt katoda jen poskytuje elektrony a chemických reakcí v elektrolytu se neúčastní, Ag anody se rozpouští za vzniku sraženiny oxidu stříbrného (Ag₂O) nebo chloridu stříbrného (AgCl; podle druhu použitého elektrolytu) pevně ulpívajících na anodě, čímž se snižuje její citlivost (zmenšuje se výstupní signál detektoru). Proto je zapotřebí po určité době provozu elektrodu vyčistit a obnovit tak její elektrické vlastnosti. Toho lze dosáhnout dvěma způsoby – mechanickým nebo elektrickým. Při mechanickém se usazenina obrušuje vhodným abrazivem, např. hustou vodní suspenzí jemně mletého korundového prášku nasáknutého do smotku vaty na špejli. Při elektrické regeneraci se elektrody ponořené do elektrolytu přepólují a usazenina se rozpustí probíhající elektrolýzou.

Listová disková komůrka

Výměna O₂ mezi vzorkem a vnitřním prostředím tohoto přístroje a následná detekce O₂ čidlem probíhá v plynné fázi. Jak už název napovídá, s listovou diskovou komůrkou se měří výměna kyslíku, jejímž původcem je listové pletivo. Nejčastěji se používá vzorek pletiva tvaru disku o ploše 10 cm². Je však možné také měřit s menšími kousky listů nebo jejichlemi. Zařízení má válcovitý tvar o průměru asi 8 cm a výšce zhruba 13 cm. Rozměry mírně zvětšují nástavce pro optické kabely a pro přívod a odvod vody z termostatu. Skládá se ze tří částí, které se na sebe upevňují. Mezi spodním a prostředním dílem je sevřen O₂ detektor exponovaný svou Pt katodou do prostředního dílu. Obě spojení jsou těsněna gumovými o-kroužky. Horní a spodní díl jsou v tomto pořadí uvedeny na požadovanou teplotu vodou z oběhového termostatu. Spodní díl, na kterém spočívá detektor O₂, musí být udržován při konstantní teplotě z důvodu výrazné fyzikálně dané závislosti výstupního elektrického signálu na teplotě (obr. 4). Kdyby se tak nedělo, znamenalo by to, že by se při měření odezva detektoru na změny parciálního tlaku (množství) O₂ v komůrce výrazně měnila i se změnami teploty. Na prostředním dílu jsou dva protilehlé kohouty, jejichž prostřednictvím lze komůrku podle potřeby proplachovat plyny či jejich směsmi v závislosti na povaze pokusu. Na začátku série měření se jeden z kohoutů používá pro kalibraci celého zařízení



4 Teplotní závislost kyslíkového detektoru Clarkova typu. Schodové změny na záznamu představují zvýšení signálu detektoru v reakci na postupné skokové zvyšování teploty zařízení v rozmezí 25–40 °C pomocí vodního oběhového termostatu. V uvedených okamžicích se na ovládacím panelu termostatu nastavila teplota na udané hodnoty. Jelikož v hermeticky uzavřené komůrce nebyl přítomen zdroj ani spotřebič O₂, bylo zvýšení elektrické odezvy čistě důsledkem změny teploty zařízení.

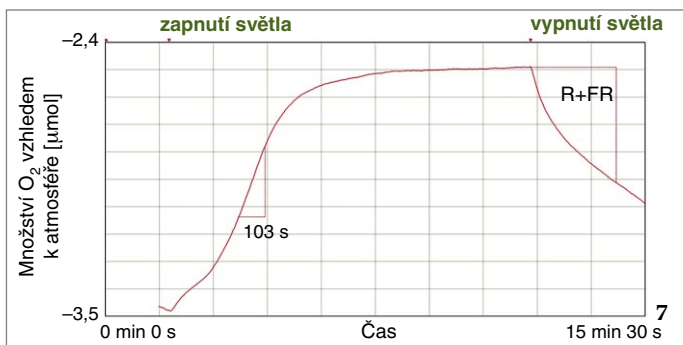
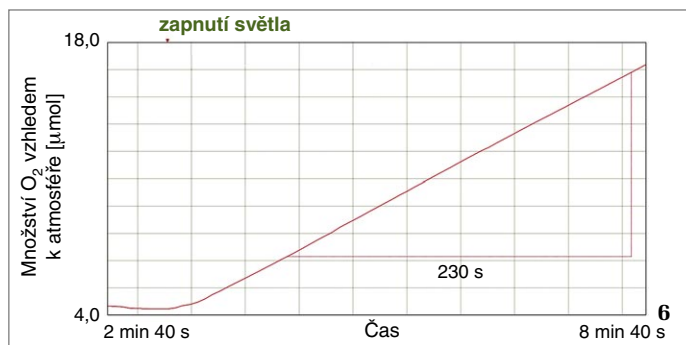
5 Blokové schéma měřicí sestavy s listovou diskovou komůrkou

6 Výdej O₂ při saturační koncentraci CO₂ vyvolané přítomností nasyceného roztoku hydrogenuhlíkatu sodného (NaHCO₃) v měřicí komůrce. Záznam zůstává dlouho lineární. Vzorek z listu slunečnice roční (*Helianthus annuus*) při 40 °C a hustotě zářivého toku zhruba 1 000 μmol (fotonů) · s⁻¹ · m⁻², vypočtená rychlost čisté fotosyntézy 41,05 μmol (O₂) · s⁻¹ · m⁻² (změna množství O₂ byla pro výpočet měřena po dobu 230 s).

7 Výdej O₂ při laboratorní koncentraci CO₂. Měřicí komůrka na začátku měření obsahovala běžnou laboratorní atmosféru. Žádný jiný zdroj CO₂ uvnitř nebyl. Výdej je pouze krátkou dobu (pseudolineární a jeho nejvyšší možná hodnota může být jen více či méně přesně odhadnuta. Vzorek z listu slunečnice při 25 °C a hustotě zářivého toku asi 560 μmol (fotonů) · s⁻¹ · m⁻², odhadnutá rychlost čisté fotosyntézy 5,93 μmol (O₂) · s⁻¹ · m⁻² (změna množství O₂ měřena po dobu 103 s). Záznam se s postupujícím časem a úbytkem CO₂ ohýbá rovnoběžně s časovou osou, kdy se výdej a spotřeba O₂ vzájemně vyrovnají – uvolněný CO₂ se okamžitě spotřebuje fotosyntézou. Ihned po vypnutí světla vlivem respirace (R) a „dobíhající“ fotorespirace (FR) rychle klesá množství O₂ v komůrce, než se záznam linearizuje poté, co ustane fotorespirace. Všechny snímky a orig. J. Květoň

(viz níže). Horní díl je opatřen průhledným oknem stejného tvaru a plochy, jako má vzorek (10 cm²), pro vstup světelného záření z vnějšího zdroje. Voda cirkulující v tomto dílu slouží jako tepelný filtr pro procházející záření. Na horním dílu jsou vedle průhledu ještě tři nástavce pro nasunutí optických kabelů fluorometru. Rozšíření umožňuje současné měření fluorescence chlorofylu s měřením výměny O₂.

Mezi prostředním a horním dílem komůrky vzniká při jejím uzavření malý prostor válcovitého tvaru (o objemu menším než 10 cm³), kam se vkládá vzorek, a kde tím



pádem dochází k vlastnímu procesu výdeje nebo spotřeby O_2 . Vzorek se zpravidla umísťuje na konstrukci z několika disků vyrobených z různých materiálů. Každý z disků má svou roli. Dospodu se dává kovová podložka a na ni disk z porézní látky schopné pojmout malé množství roztoku, z něhož se bude během měření uvolňovat CO_2 potřebný pro fotosyntézu. Jako oddělovač, aby se ostatní součásti sestavy nedotýkaly vlhké látky, se vloží kovová síťka. Na ni molitanový disk, sloužící v konstrukci jako pružina. Následuje další kovová síťka jako oddělovač a další disk z porézní látky, která se v tomto případě zvlhčuje malým množstvím vody (obvykle o objemu 100–200 μl), aby případně list při měření netrpěl nedostatkem vody. Jako poslední se nahoru vloží vzorek. Komůrka se uzavře, přičemž sestava disků ji zcela vyplní a vzorek je přitisknut zespodu na průhledné okno horního termostataného dílu, čímž je udržován na konstantní teplotě. Sledovat změny v parciálním tlaku (množství) O_2 lze jen za předpokladu, že je komůrka oddělena od vnějšího prostředí, tedy spojením všech dílů dokonale utěsněno. Schéma celé měřicí sestavy s listovou diskovou komůrkou ukazuje obr. 5.

● Kalibrace zařízení

Kalibrací se rozumí získání elektrické odezvy detektoru na přesně definovanou změnu parciálního tlaku (množství) O_2 v komůrce. Jde tedy o číselný údaj změny elektrického napětí vyvolaný změnou parciálního tlaku O_2 . Hodnota kalibrace se pak při vyhodnocování analýz používá v opačném smyslu – ze změřené změny elektrického signálu se vypočítá změna množství O_2 za dobu měření. Při kalibraci se do jednoho z kohoutů na prostředním dílu komůrky při uzavření druhého kohoutu i celé komůrky zasune plynotěsná stříkačka s přesně odměřeným objemem kalibračního plynu (vzduchu) o známé teplotě a obsahu O_2 a celý objem se vpraví do komůrky, čímž se v ní zvýší parciální tlak (množství) O_2 o přesně danou hodnotu. To má za následek proporcionální zvýšení elektrického signálu detektoru přesně podle množství vpraveného O_2 . Byl-li před začátkem kalibrace v uzavřené komůrce normální vzduch (obsahující O_2), označuje se kalibrace jako relativní k atmosféře. Existuje i absolutní kalibrace, při níž se kalibrační množství O_2 vpraví do komůrky propláchnuté plynem bez O_2 – dusíkem (N_2), vzduchem zbaveným O_2 , heliem (He) apod. Kromě uvedeného způsobu založeného na zvýšení parciálního tlaku O_2 v komůrce je možno kalibrovat také opačným přístupem – odebráním konkrétního objemu plynu z komůrky stříkačkou, doprovázeným patřičným snížením elektrického signálu. Tento typ

Tab. 1 Smísením různě koncentrovaných roztoků hydrogenuhličitanu sodného ($NaHCO_3$) a uhlíčitanu sodného (Na_2CO_3) lze nad těmito směsmi v plynné fázi získat odlišné koncentrace oxidu uhličitého (CO_2). Příklady Warburgových pufrů obsahujících roztoky 0,1M Na_2CO_3 a 0,1M $NaHCO_3$ v různém poměru poskytující rozdílné koncentrace CO_2 v plynné fázi. Údaje platí pro 25 °C. Upraveno podle: O. H. Semikhatova a kol. (1971)

Na_2CO_3 [mM]	$NaHCO_3$ [mM]	CO_2 pufr [μM]	pH atmosféra [‰]
85	15	0,48	0,014
80	20	0,90	0,027
75	25	1,49	0,044
70	30	2,29	0,068
60	40	4,68	0,139
50	50	8,67	0,258
35	65	20,50	0,611
25	75	37,50	1,120
15	85	78,70	2,350
10	90	131,00	3,900
5	95	290,00	8,650

kalibrace lze aplikovat pouze v případě, že je v plynu v komůrce obsažen O_2 . Při použití programu OxyTrace+ probíhá kalibrace poloautomaticky. Přístroj vyzve experimentátora k zadání teploty kalibračního plynu a jeho tlaku a v několika krocích k úkonům spojeným s kalibrací. Vyhodnocení a výpočet kalibrace proběhnou už nezávisle.

● Fotosyntetický výdej kyslíku

Měření výměny plynů s listovou diskovou komůrkou začíná tak, že se do otevřené komůrky vloží sada disků z různých materiálů (viz výše), podle potřeby se na spodní disk z porézní látky odměří roztok uvolňující CO_2 a na druhý (vrchní disk) několik kapek vody, nahoru na sestavu se vloží vzorek a komůrka se uzavře. Nad horní okno se nainstaluje zdroj záření a vzorek se ještě za tmy nechá nějakou dobu stabilizovat. Pokud bude vzorkem objekt schopný fotosyntézy, znamená to, že bude ve tmě respirovat – spotřebovávávat O_2 – a na záznamu se objeví klesající linie dokumentující spotřebu O_2 . Až bude záznam rovnoměrný, můžeme spustit fotosyntézu zapnutím zdroje viditelného záření. Vzorek začne produkovat O_2 a linka ihned změní směr (začne stoupat). Při měření výměny O_2 nám obecně jde o postižení té části záznamu rychlosti výměny, která je konstantní v čase (stacionární) čili přímková (lineární) na časovém záznamu. Přístroj udává čistou rychlost výdeje O_2 automaticky „očistěnou“ od fotorespirace a denní respirace – procesů spotřebovávajících O_2 .

Pro měření fotosyntetického výdeje O_2 jsou zásadní tři volitelné parametry – teplota, koncentrace CO_2 a intenzita záření. Vliv teploty na detektor už byl zmíněn a vzhledem k závislosti fotosyntézy na teplotě je během měření nutné udržovat konstantní zvolenou hodnotu. Se zvyšující se teplotou se zvyšuje i rychlost výdeje O_2 až do určité hodnoty charakteristické pro použitou rostlinu. Totéž platí pro vliv intenzity záření. Ke zmíněným závislostem dospějeme změřením teplotních a světelných křivek.

Pro měření je možno používat koncentrace CO_2 od nuly až po saturační koncentraci. Často se volí právě saturační koncentrace pro snadnost dosažení. Jako zdroj CO_2 v tomto případě slouží nasycený roztok hydrogenuhličitanu sodného ($NaHCO_3$). Odměruje se ho 200 μl na spodní látkovou podložku v komůrce. Do atmosféry komůrky se potom průběžně uvolňuje CO_2 a dosahuje v ní koncentrace jednotek procent. Za této situace je zcela odstíněn vliv průduchů a CO_2 je přítomen na karboxylačních místech v chloroplastech v saturační koncentraci. Lineární rychlost výdeje O_2 je pak dosažena rychle po začátku ozařování vzorku a je dlouhodobá (obr. 6). Alternativou k nasycenému roztoku $NaHCO_3$ je obohacení atmosféry v komůrce přímo CO_2 z tlakové lahve v množství odpovídajícím požadované výsledné koncentraci v řádu jednotek procent. Stacionární rychlost výdeje O_2 však za uvedených podmínek vydrží kratší dobu ve srovnání s předchozím případem. Saturační koncentrace CO_2 je nicméně nefyziologická, proto se pro situace bližší přirozeným podmínkám nebo takovým, které vyplývají z konkrétního pokusu, dají používat jeho nižší koncentrace v komůrce.

K navození různých koncentrací CO_2 mohou sloužit Warburgovy pufrů (tab. 1). Vzorek listového pletiva se také dá uzavřít v komůrce jen s atmosférickou koncentrací CO_2 . V tomto případě je však stacionární část časového záznamu rychlosti výdeje O_2 velmi krátká a odečteme ji jen přibližně. Křivka záznamu se s klesající rychlostí výdeje O_2 stáčí do vodorovného směru, až po určité době dosáhne tvaru přímky rovnoběžné s časovou osou. Výdej O_2 (fotosyntéza) se vyrovnal s jeho spotřebou (fotorespirací a denní respirací) a nastala dynamická rovnováha, při níž se celkové množství O_2 nemění (obr. 7). Rychlost fotorespirace a denní respirace nelze z uvedených záznamů jednoduchým způsobem získat. Jsou k tomu zapotřebí sofistikované přístupy většinou i s využitím jiných metod.

● Spotřeba kyslíku

Po vypnutí zdroje záření se fotosyntetizující pletivo octne ve tmě a okamžitě přejde na (temnostní) respiraci – spotřebu O_2 . Časový

záznam rychlosti respirace se postupně linearizuje. U C_3 rostlin může být počáteční rychlost respirace velká, což se odráží v prudkém poklesu množství O_2 v komůrce (obr. 7, oblast respirace a fotorespirace, R+FR). Jev má spojitost s fotorespirací pokračující ještě nějakou dobu po vypnutí záření (analogie k výronu CO_2 po vypnutí záření). U C_4 a CAM rostlin popsáný jev nastává, protože tyto typy rostlin vykazují zanedbatelnou fotorespiraci. Čím vyšší je fotosyntéza, tím je vyšší okamžitě poté měřená temnostní respirace, což může svědčit o tom, že přednostně jsou prodávány aktuálně nasycené primární produk-

ty. Je-li jich fotosyntézou vytvořeno více, může jich být také v daném okamžiku více využito pro respiraci.

Kromě měření výměny O_2 u fotoautotrofních objektů, jak je popsáno v předchozích statích, lze v kyslíkové komůrce měřit spotřebu O_2 u jakéhokoli objektu (biologického, organického nebo anorganického), který spotřebu O_2 může vykazovat.

Komůrka pro kapalně či vodní vzorky
Komůrka pro měření kapalných vzorků od stejného výrobce jako listová disková komůrka používá stejný elektrochemický detektor. Slouží k měření výměny O_2 u vod-

ních organismů (řas, sinic, vodních rostlin apod.), ale i protoplastů, buněčných organel (mitochondrií, chloroplastů) a jejich částí (tylakoidních membrán). Může být použita i pro speciální analýzy, jako jsou aktivity fotosystému I a fotosystému II nebo měření oxidační aktivity enzymů a zůstane-li u fotosyntézy, pak jde o oxygenázovou aktivitu Rubisco.

Bližší popisy techniky, metod a aplikací používaných při práci s komůrkou na kapalně vzorky jsou však nad rámec této stati.

Použitá literatura uvedena na webové stránce Živý.

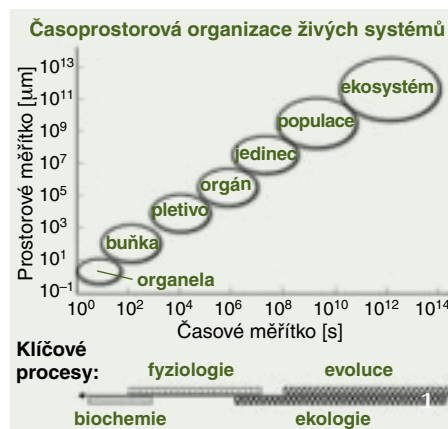
Otmar Urban, Lucie Homolová, Marian Pavelka, Alexander Ač

Globální fotosyntéza suchozemských ekosystémů: od chloroplastu po kontinent

Fotosyntéza je základní a jedinečný biochemický proces, který na naší planetě představuje pomyslnou hranici mezi anorganickým (neživým) a organickým (živým) světem. Během ní dochází, za přispění energie sluneční radiace, k tvorbě organických sloučenin (cukrů) z jednoduchých molekul oxidu uhličitého (CO_2) a vody. Výsledné produkty fotosyntézy pak přímo či nepřímo poskytují nezbytnou energii a organickou hmotu pro fungování složitých a vzájemně propojených potravních sítí v suchozemských i vodních ekosystémech. Vytváří tak základ pro obrovskou rozmanitost nejen rostlinné, ale i živočišné říše. Kromě udržování potravních řetězců a produkce kyslíku sehrává fotosyntéza klíčovou roli i v globálním cyklu uhlíku. Jak známo, CO_2 není jen vstupním substrátem fotosyntézy, ale také významným skleníkovým plynem, který ovlivňuje energetickou bilanci planety a přispívá ke změnám klimatu. Schopnost ekosystémů fixovat CO_2 prostřednictvím fotosyntézy a uchovávat uhlík v biomase nebo půdě je přirozeným regulačním mechanismem, ovlivňujícím koncentraci CO_2 v atmosféře, a tím i stabilitu klimatického systému jako celku.

Tváří v tvář globálnímu oteplování, způsobenému zejména zvyšováním koncentrace skleníkových plynů v atmosféře a změnami ve využívání krajiny (např. odlesňováním), je porozumění procesům, které regulují globální fotosyntézu, důležitější než kdy dříve. Její sledování a kvantifikace nám umožňují lépe posuzovat dopady rostoucí atmosférické koncentrace CO_2 a měnícího se klimatu – včetně vlivů sucha, dlouhodobých vln veder i jiných extrémních jevů – na fungování ekosystémů a zpřesnit scénáře budoucího vývoje klimatu. Existuje totiž reálné riziko, že s pokračující změnou klimatu může dojít k oslabení fotosyntetické kapacity biosféry a následně ke snížení její regulační funkce v klimatickém systému Země. V tomto článku se přitom zaměřujeme výhradně na fotosyntézu suchozemských (terestrických) ekosystémů.

Pod pojmem „globální fotosyntéza“ zde rozumíme souhrnnou rychlost, jakou všechen zelený organismy na souši (vyšší rostliny, řasy a sinice) v daném okamžiku fixují CO_2 . Schopnost terestrických ekosystémů – od tropických pralesů až po tundru – poukázat atmosférický uhlík se však výrazně liší v čase i prostoru. Ovlivňují ji faktory jako druhové složení, hustota a stáří vegetace, její zdravotní stav, aktuální dostupnost vody, světla a živin a aktuální stav počasí. Stanovit celkový rozsah fotosyntetické aktivity na globální úrovni proto znamená výzvu, která přetrvává již více než půl století. Shodou okolností, první úvahy o možnosti kvantifikovat globální fotosyntézu a produkci ekosystémů zazněly již v r. 1969 na mezinárodním fotosyntetickém kongresu v Třeboni. Tehdy však mnozí odborníci pochybovali, že by bylo možné popsat a změnit fotosyntézu na úrovni větších krajinných



celků, natož na úrovni celé planety. Hlavním důvodem pochybností byla – a stále je – mimořádná složitost procesů, které fotosyntézu ovlivňují. Tyto procesy, často velmi dynamické a vzájemně propojené, probíhají napříč širokým rozsahem prostorových a časových měřítek: od molekulárních reakcí v chloroplastech až po výměnu uhlíku mezi kontinenty a atmosférou. Komplexní povaha dějů proto vyžaduje spolupráci řady vědních oborů – od biochemie, biofyziky a fyziologie rostlin přes ekosystémovou ekologii a dálkový průzkum Země až po klimatologii a modelování (obr. 1). Současné pokročilé měřicí systémy a výkonná výpočetní technika nám dnes umožňují globální fotosyntézu sledovat a s určitou mírou jistoty i kvantifikovat, včetně jejich časových a prostorových změn.

Od listu k porostu: klíčové nástroje a úloha „světla“

Za zásadní technologický pokrok ve výzkumu fotosyntézy lze považovat vývoj nedisperzního infračerveného analyzátoru plynů (Infra-Red Gas Analyser, IRGA) v 50. letech 20. století. Přístroj umožnil citlivé, přesné a nepřetržité měření koncentrací CO_2 a vodní páry. Právě tato schopnost přinesla do fyziologie rostlin zásadní změnu a vedla k rychlému rozvoji studia fotosyntézy (bližší na str. 152–156 této Živý). Následná miniaturizace a technické zdokonalování těchto systémů dovolily nejen měřit rychlost, s jakou rostliny dokážou přijímat (asimilovat) CO_2 , ale i stanovit míru otevřenosti průduchů na povrchu listů a rychlost výparu vody z rostlin, a to přímo v terénu. Zároveň se otevřela možnost zkoumat odezvu fotosyntézy na podmínky vnějšího prostředí, jako jsou sluneční záření (radiace), koncentrace CO_2 , teplota a řada dalších.