

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ROSTLIN**



**Přírodovědecká  
fakulta  
Faculty  
of Science**

**Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice**

**STABILNÍ IZOTOPY A JEJICH POUŽITÍ  
V BIOLOGII A EKOLOGII**

Skriptum

Jiří Šantrůček  
Hana Šantrůčková  
a kolektiv

---

2014

Název: Stabilní izotopy a jejich použití v biologii a ekologii

Autoři: Eva Kaštovská, Jiří Květoň, Jiří Šantrůček, Hana Šantrůčková, Karolina Tahovská

Vydalo: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Vyšlo: 2014

Vydání: první

Místo vydání: České Budějovice

ISBN: 978-80-7394-481-0

Neprošlo jazykovou úpravou.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Toto skriptum bylo napsáno za přispění finančních prostředků z operačního programu pro vzdělávání a konkurenceschopnost MŠMT ČR prostřednictvím realizace projektu:

**Platforma pro studium a inventarizaci lesních ekosystémů  
CZ.1.07/2.4.00/31.0214**

„*Felix qui potuit rerum cognoscere causas.*“

Vergilius (29 PK)

## OBSAH

<b>ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
Proč studovat stabilní izotopy – povzbuzení ke studiu .....	1
Řekni mi své $\delta^{13}\text{C}$ a já ti povím, co jíš a odkud jsi .....	1
Stromy zavlažující půdu.....	2
Stabilní izotopy v nás ... a ve skriptech.....	3
Zachovalý stabilně izotopový osmdesátník nabízí své služby, ale... ..	4
Vytvoř si vlastní projekt.....	5
<b>1 STABILNÍ IZOTOPY – TERMINOLOGIE, ANALÝZY, PŘÍRODNÍ VÝSKYT .....</b>	<b>7</b>
Jiří Květoň	
1.1 Prvky, nuklidy, izotopy .....	7
1.2 Analýzy stabilních izotopů.....	9
1.2.1 Hmotnostní spektrometrie .....	10
1.2.2 Optická spektroskopie.....	13
1.3 Vyjadřování izotopového složení látek a jeho změn.....	14
1.3.1 Přirozený výskyt stabilních izotopů .....	14
1.3.2 Značení stabilními izotopy .....	16
1.4 Seznam použité literatury .....	17
<b>I. UHLÍK.....</b>	<b>19</b>
<b>2 FRAKCIONACE IZOTOPŮ UHLÍKU PŘI FOTOSYNTÉZE ANEB PROČ JSME OCHUZENI O TĚŽKÝ IZOTOP UHLÍKU? .....</b>	<b>19</b>
Jiří Šantrůček	
2.1 Vysvětlení na úvod a trocha historie .....	19
2.2 Kinetická izotopová frakcionace $\text{CO}_2$ během difuze .....	21
2.3 Kinetická izotopová frakcionace během fotosyntetické fixace $\text{CO}_2$ .....	23
2.4 Rovnovážná frakcionace uhlíku při fotosyntéze .....	25
2.5 Izotopová diskriminace uhlíku v živé rostlině. Kvantitativní přístup .....	26
2.5.1 $\text{C}_3$ rostliny.....	26
2.5.2 $\text{C}_4$ rostliny.....	31
2.5.3 CAM rostliny .....	32
2.6 Shrnutí .....	33
2.8 Aplikace, případové studie.....	34
2.8.1 Účinnost využití vody rostlinami měřená pomocí stabilních izotopů uhlíku .....	34
2.8.2 Bariéry pro transport $\text{CO}_2$ do chloroplastů; Měření mezofylové vodivosti pomocí diskriminace uhlíku $^{13}\text{C}$ .....	38

2.7 Seznam použité literatury.....	40
<b>3 SLEDOVÁNÍ TOKU C V SYSTÉMU ROSTLINA-PŮDA POMOCÍ CO<sub>2</sub> ZNAČENÉHO IZOTOPEM <sup>13</sup>C .....</b>	<b>41</b>
Eva Kaštovská	
3.1 Vztah rostlina-mikroorganismy-půda .....	41
3.2 Alokace (distribuce) uhlíku rostlinou.....	42
3.3 Tok uhlíku pod zem .....	42
3.4 Značení rostlin pomocí stabilních izotopů C .....	43
3.4.1 Pulzní značení rostlin pomocí <sup>13</sup> C-CO <sub>2</sub> : podmínky a postup.....	45
3.5 Aplikace, případové studie.....	47
3.5.1 Pulzní značení rostlin pomocí <sup>13</sup> C-CO <sub>2</sub> .....	47
3.6 Seznam použité literatury.....	50
<b>4 PRIMING EFEKT .....</b>	<b>51</b>
Eva Kaštovská	
4.1 Priming efekt a jeho dělení .....	51
4.2 Dynamika priming efektu .....	54
4.3 Mechanismus vzniku priming efektu .....	54
4.4 Měření priming efektu: princip a výpočty .....	55
4.5 Aplikace, případové studie.....	57
4.5.1 Porovnání priming efektu po přidavku dvou různých substrátů .....	57
4.6 Seznam použité literatury.....	59
<b>II. DUSÍK.....</b>	<b>60</b>
<b>5 IZOTOPOVÁ FRAKCIONACE DUSÍKU V EKOSYSTÉMU .....</b>	<b>60</b>
Hana Šantrůčková	
5.1 Koloběh dusíku v suchozemském ekosystému .....	60
5.2 Diskriminace <sup>15</sup> N spojená s transformací N.....	62
5.3 Posun izotopového signálu <sup>15</sup> N v půdě. ....	64
5.4 Odhad fixace N <sub>2</sub> .....	66
5.5. Příspěvek mykorhizních hub k výživě N rostlin .....	67
4.6 Seznam použité literatury.....	72
<b>6 IZOTOPOVÁ ZŘEĎOVACÍ METODA (POOL DILUTION TECHNIQUE) .....</b>	<b>73</b>
Karolina Tahovská	
6.1 Hrubé a čisté toky procesů přeměny N v půdě .....	73
6.2 Princip <sup>15</sup> N zřed'ovací metody.....	74
Obr. 6.2.1 <sup>15</sup> N.....	75

6.3 Zřetřovací <sup>15</sup> N metoda v praxi .....	77
6.3.1 Stanovení hrubé mineralizace <sup>15</sup> N zřetřovací metodou.....	78
6.4 Aplikace, řipřadové studie.....	79
6.4.1 Porovnání hrubých a řistých toků N v zemředřelských a luřních půdách ..	79
6.5 Seznam použité literatury.....	80
<b>III. KYSLÍK A VODÍK.....</b>	<b>82</b>
<b>7 IZOTOPOVÁ FRAKCIONACE VODY .....</b>	<b>82</b>
Jiří řantrřeřek	
7.1 Proř prřší v Praze lehřší voda neř v Londýně? .....	82
7.2 Izotopová frakcionace vody pod fyzikální m drobnohledem.....	85
7.3 Meteorická římka ukazuje co se s vodou řeřlo v hydrologickém cyklu .....	86
7.4 Dalřší faktory ovlivňující frakcionaci vody v krajině, izotopové mapy.....	88
7.5. Voda v půdě a v rostlině.....	91
7.5.1. Voda v půdě, evapotranspirační tok a rozliření jeho složek .....	91
7.5.2. Izotopové ochuzení vypařeně vody (Craig-Gordonův vztah).....	93
7.5.3. Izotopové složení vody v rostlině a v půdě v jejím okolí .....	95
7.5.4. Izotopové složení vody v listech rostlin.....	97
7.6 Otisk izotopového složení vody v organických lřátkách v rostlinách a řivořiších .....	99
7.7. řhrnutí .....	101
7.8 Seznam použité literatury.....	102





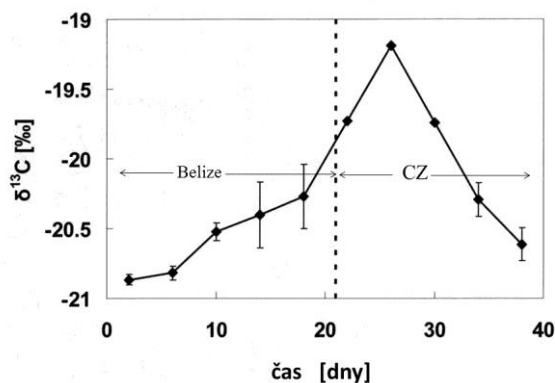
# ÚVOD

## Proč studovat stabilní izotopy – povzbuzení ke studiu

Skriptum, které jste otevřeli je primárně určené pro ty z vás, kdo se zabýváte studiem živé přírody a interakcemi života s neživou přírodou. V Úvodu nechceme nabídnout jen obvyklé informace o kapitolách, které budou následovat a významu oboru, který se vám, jak doufáme, otevře, ale rádi bychom zde začali jakousi „ochutnávkou“ a přidali charakteristiky stabilně izotopových metod a několik rad pro nedočkavce, kteří po přečtení úvodu už začínají plánovat své vlastní pokusy. Obáváme se, že pokud bychom začali systematickým výkladem z fyzikální chemie stabilních izotopů a pojednáním o technice, kterou se měří apod., tak vás odradíme už od prvních odstavců, protože nebudete vědět k čemu to všechno je dobré. Začneme tedy raději několika trochu kuriózními ale snad atraktivními příklady, které pomohou udělat si představu o tom, jak užitečným a intelektuálně přitažlivým nástrojem mohou stabilní izotopy být, když víte k čemu a jak jich použít.

### *Řekni mi své $\delta^{13}\text{C}$ a já ti povím, co jíš a odkud jsi*

Svět člověka je světem Odkud? Kam? Kdy? Na jak dlouho? Jak rychle? Světem cestování, migrace s nejrůznějšími přivlastky. V jistém smyslu to platí i o mnoha druzích živočichů, stěhovavých ptácích především. Zvědavost i jiné motivace jako např. snaha chránit přírodu nás vedou k touze poznat, kam ptáci odlétají na zimu, kde se páří, čím se během cesty živí ale také např. jak se mění prostředí jejich dočasného domova. Odlišná místa na naší planetě jsou specifická mimo jiné zastoupením stabilních izotopů biogenních prvků (jejich obsah lze měřit a označuje se řeckým písmenem delta,  $\delta$ ), a tato specifčnost přechází do těla všeho živého s potravou. My i všechno živé se proto stáváme izotopovými reprezentanty lokalit, ve kterých pobýváme. Pokud by se obsah izotopu projevoval např. škálou barev a my měli schopnost je vidět, měnilo by naše tělo barvu podle toho, jak bychom se stěhovali z místa na místo. Když je součástí těla nějaké „záznamové medium“ jako třeba vlasy, vousy, nehty, chlupy v ocasu, peří ptáků, krunýř želv nebo roh, které neustále přirůstají, můžeme místo a dobu pobytu, dokonce rekonstruovat zpětně pomocí jejich měnící se izotopové „barvy“. Udělejme pokus sami na sobě. Představte si, že žijete v České republice a naskytla se vám možnost odletět na tři týdny do Střední Ameriky, např. státu Belize. Po přeletu pravidelně (např. každý druhý den) odeberete vzorek tkáně svého těla, např. přirostlé vousy (tvořené hlavně strukturální bílkovinou keratinem), které oholíte, označíte a uschováte. Po příjezdu v podobné činnosti ještě nějakou dobu pokračujete a poté vzorky analyzujete na obsah izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$ , tedy získáte hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$ . Výsledný časový záznam změn  $\delta^{13}\text{C}$  během vaší „migrace“ by mohl vypadat podobně jako v grafu na obr. 1. Příčinou vzestupu hodnot  $\delta^{13}\text{C}$  k méně záporným (tj. obohacení těla o izotop uhlíku) je náhlý přechod na stravu založenou na produktech z tzv.  $\text{C}_4$  rostlin (např. cukrová třtina, kukuřice, čirok), zatímco před cestou a po návratu do Čech testovaná osoba byla závislá převážně na domácích  $\text{C}_3$  rostlinách a produktech z nich (např. cukr z cukrové řepy, pšenice, maso zvířat krmených  $\text{C}_3$  plodinami). Rychlost návratu  $\delta^{13}\text{C}$  k původním tj. „českým“ hodnotám ukazuje také na dobu (poločas) obratu uhlíku v těle, tedy metabolickou aktivitu tkáně (v tomto případě se během asi 20 dnů vyměnila polovina uhlíku v podkožní vrstvě, kde se vousy tvoří).



Obr. 1 Časové změny v obsahu izotopu  $^{13}\text{C}$  v keratinu (vousech) člověka žijícího dlouhodobě v České republice (CZ) poté co přesídlil do Belize (dny 1-20) a vrátil se zpět (dny 21-39); (Šantrůček, Hisem, Rossmann, nepublikováno).

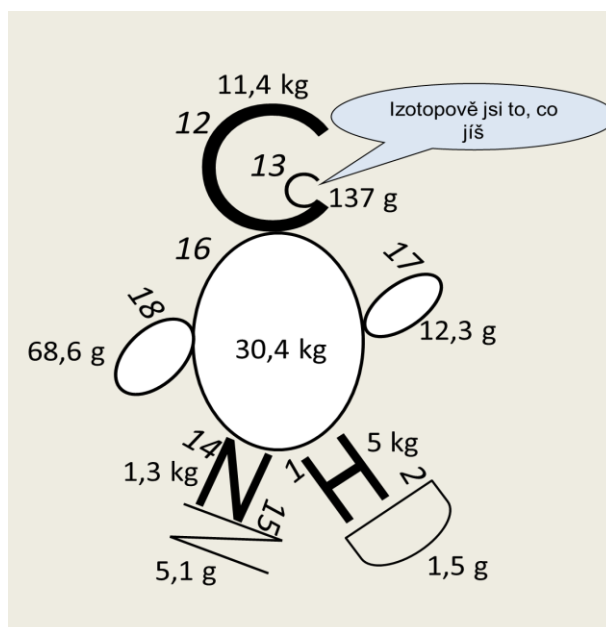
Informace o rozdílech v izotopech uhlíku mezi  $\text{C}_3$  a  $\text{C}_4$  rostlinami získáte v kapitole 2 a o dalších izotopech využívaných pro sledování migrace živočichů v kapitole 7. Geograficky a druhově specifického zastoupení izotopů využívají kromě přírodovědců z nejrůznějších oborů také forenzní vědy např. k odhalení původu vzorků biologické povahy, archeologie (vzorky kolagenu, kostí, zubní tkáň) ke zkoumání migrace lidí, jejich dietetických návyků a introdukce nových plodin našimi předky, nebo státní správa (např. celní laboratoře, potravinářská inspekce) ke kontrole pravosti a původu rostlinných a živočišných produktů.

### ***Stromy zavlažující půdu***

Vzrostlý strom spotřebuje ohromné množství vody za sezónu. Uvažovali jste někdy, zda ten strom, na který se zrovna díváte, využívá spodní hlubinnou vodu (např. tu, která bývá ve studni) nebo vodu ve svrchních vrstvách půdy, která pochází z deště? Pro strom je taková „úvaha“ klíčová má-li přežít – podle ní musí investovat více do růstu kořenů než větví a směřovat růst kořenů. Pro nás je pak klíčové „rozhodnutí“ stromu chceme-li aby plnil ekologickou funkci, kterou jsme mu přisoudili i po našem případném zásahu do přírody. Měřením množství stabilních izotopů kyslíku a vodíku ve vodě z kmene stromu a z různých vrstev půdy můžeme odpovědět na otázku, odkud strom vodu čerpá, protože voda ze srážek a podzemní voda mají obvykle různé izotopové složení kyslíku i vodíku. Podobně díky izotopům můžeme zjistit kolik vody, která se vypařuje z porostu lesa nebo z krajiny prošla přes listy (strom jí vytranspiroval) a kolik se jí vypařilo z povrchu půdy. Zkoumání izotopového složení půdní vody a vody ve stromu pomohlo před lety odhalit do té doby netušenou vlastnost (některých?) stromů. A sice to, že během noci nebo jiné periody nízké transpirace strom z povrchových vrstev půdy vodu nebere, ale naopak ji tam přidává, „zavlažuje“ své bezprostřední okolí. Vodu, kterou používá k zavlažování, čerpá ze zvodnělých vrstev horniny (podzemní voda) a přemísťuje ji do povrchového horizontu půdy. Více detailů o tomto „hydraulickém výtahu“ se dozvíte v kapitole 7.5.3.

### ***Stabilní izotopy v nás ... a ve skriptech***

Jak jsme naznačili na zmíněných příkladech, stabilní izotopy jsou běžnou součástí okolní přírody a jako takové jsou bezpečné, nerozpadají se jako radioaktivní izotopy a při svém přirozeném výskytu neohrožují lidské zdraví. Každý z nás je směsí stabilních izotopů. Lidské tělo se skládá hlavně z vody a organických látek. Podle toho také obsahuje nejvíce kyslíku, vodíku, uhlíku a dusíku. Tyto prvky jsou v našem těle zastoupeny hlavně svými lehkými izotopy s malou příměsí těžkých izotopů. Jak moc malá ta příměs je, závisí hlavně na izotopovém složení stravy, kterou přijímáme. Důvtipné schéma na obr. 2, ukazující izotopové složení průměrného 50-ti kilogramového člověka, dokumentuje, že každý z nás je součástí úžasného soukolí nepřetržitého izotopového míchání a rozdělování (frakcionace), které probíhá od subbuněčné až po globální úroveň.



Obr. 2 Izotopové složení uhlíku (hlava, ústa), kyslíku (tělo, ruce), dusíku (levá noha) a vodíku (pravá noha) průměrného 50 kg těžkého člověka (modifikováno podle Fry 2006)

K tomu, abychom mohli plně pochopit a aplikovat zákonitosti přerozdělování izotopů při řešení našich projektů, musíme nejprve vstřebat základní fakta o stabilních izotopech, musíme vědět o čem je řeč, znát terminologii. Přehled toho najdete v první kapitole. Vše ostatní obsažené ve skriptu je rozděleno do tří oddílů podle izotopů prvků, o kterých se pojednává na „uhlík“ (kap. 2-4), „dusík“ (kap. 5, 6) a „kyslík s vodíkem“ (kap. 7). Kapitoly 2-4 přinášejí základní informace o primární frakcionaci stabilních izotopů uhlíku v biosféře, tj. o frakcionaci během fotosyntézy, o využití izotopových metod pro sledování toků uhlíku z rostliny do půdy a do mikrobiálních společenstev žijících v půdě. Kapitoly 5 a 6 jsou věnovány přirozené frakcionaci izotopů dusíku v ekosystémech a využití tzv. zředovací izotopové metody pro studium přeměn forem dusíku v půdě. V kapitole 7 je pak základní penzum informací o výskytu a rozdělování stabilních izotopů

prvků obsažených v molekule vody tj. kyslíku a vodíku, hlavně pak o izotopové frakcionaci vody v hydrologickém cyklu a v rostlinách. Teoretické oblasti jsme se pokusili doprovodit aplikacemi a případovými studii, tj. detailnějším popisem řešení některých úkolů, s kterými jsme se během naší práce se stabilními izotopy setkávali. Čtenář by v tomto základním učebním textu mohl postrádat podrobnější informace o post-fotosyntetické frakcionaci izotopů uhlíku v metabolismu rostlin a živočichů, podrobnější pojednání o modelech míchání a frakcionace izotopů (včetně využití Keelingových grafů, Reyleighovy destilace), detailnější informace o frakcionaci izotopů kyslíku a vodíku v metabolismu rostlin a živočichů nebo o látkově a molekulově specifickém výskytu stabilních izotopů. Nezahrnuli jsme také kapitoly o izotopech dalších biogenních prvků, které se v poslední době prosazují v biologickém a ekologickém výzkumu jako je síra nebo bór ale izotop kyslíku  $^{17}\text{O}$ . Informace, které jsou sice zajímavé, a zvědavý čtenář si je podle našeho názoru nenechá ujít, ale které nejsou nezbytné k pochopení podstaty popisovaných jevů, jsou uváděny v poznámkách pod čarou, pokud mají charakter krátké poznámky nebo kurzívou mezi dvěma čarami v textu pokud jsou delší. Seznam citovaná literatury je uveden na závěr každé kapitoly. Podmínkou porozumění podle našeho názoru nejsou předběžné znalosti vyšší matematiky, fyziky, chemie ani biologie. Spíš jen zvědavost a zdravý rozum.

### **Zachovalý stabilně izotopový osmdesátník nabízí své služby, ale...**

Stabilní izotopy umožňují ekologům a biologům **indikovat, integrovat, evidovat a značit** procesy, které hrají klíčovou roli v přírodě. Vše začalo objevem stabilního izotopu vodíku (deuteria) Urey-em a spolupracovníky počátkem 30-tých let minulého století, tedy před cca 80-ti lety, a pokračovalo aplikacemi stabilně izotopových technik ve fyzice, geologii, hydrologii a dalších „neživých“ disciplínách. Rychlý rozvoj přístrojového vybavení v posledních dekadách nastartoval používání stabilních izotopů v biologii i ekologii, a přinesl mnoho nových metodických přístupů umožňujících studovat procesy v jejich přirozeném prostředí na různých úrovních komplexity, od buňky přes jedince, populace, společenstva až po celý ekosystém a biosféru v globálním měřítku.

Přirozený výskyt stabilních izotopů – měřený pomocí poměru, v jakém jsou zastoupeny těžší a lehčí izotop - **indikuje** přítomnost nebo absenci určitého procesu, provázeného izotopovou frakcionací. Tento proces za sebou zanechává izotopovou stopu. Například zastoupení lehčího  $^{12}\text{C}$  a těžšího  $^{13}\text{C}$  izotopu, resp. jejich izotopový poměr  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  v rostlině indikuje, jaký typ fotosyntézy rostlina využívá, izotopové složení tkáně živočicha zase indikuje, co živočich konzumuje nebo odkud pochází.

Izotopové složení tkáně v sobě **integruje** průběh důležitých fyziologických i ekologických procesů v prostoru i čase. Čas, po který určitý izotop průběh procesu integruje, závisí na době obratu sledované látky v našem studovaném objektu (rezervoáru). V dobře promíchávaných velkých přírodních rezervoárech, jako jsou atmosféra nebo vodní ekosystémy, izotopový poměr sledovaného prvku obvykle reprezentuje integraci vstupu látek nezávisle na počtu a charakteru vstupujících zdrojů.

Izotopový poměr prvků **eviduje** změnu podmínek prostředí. V případě, že se látka v tkáni ukládá a lze vymezit časový úsek, ve kterém se uložila (nedochází k promíchávání), poměr stabilních izotopů může sloužit jako kronika - historický záznam odpovědi organismu na měnící se podmínky prostředí. Například izotopové složení letokruhů může sloužit jako přibližný ukazatel (proxy) teploty při které strom rostl a

jejích změn v minulosti, izotopové složení vlasů/chlupů/peří v sobě uchovává chronologický záznam o prostředí, ve kterém jedinec žil v době, kdy se daný úsek vlasu/chlupu/péra tvořil. Tyto archivy jsou vhodné např. ke sledování migrace živočichů nebo „adresy“ jejich dřívějšího pobytu.

Stabilními izotopy můžeme **označit** např. vstupy do potravních řetězců a pak stopovat co se živí čím, tedy zjišťovat výživové (trofické) preference. Můžeme tak např. odhalit, že jistý druh masožravé rostliny si ve výživě dusíkem přilepšuje rostlinným opadem a je tak vlastně „vegetarián“ (Pavlovič *et al.* 2011). Značení stabilními izotopy sleduje podobná pravidla jako značení izotopy radioaktivními. Má ale tu výhodu, že jej lze provádět bez rizika radioaktivního ozáření a tedy ne jen v přísně sledovaných laboratorních podmínkách.

Nikdy bychom neměli zapomínat, že stabilní izotopy, ač jsou zde cílem našeho studia, jsou hlavně prostředkem - nástrojem, jak pochopit a kvantifikovat procesy probíhající v přírodě. Jejich měření by mělo být vždy provázeno znalostí procesu, který je předmětem našeho zájmu, znalostí, zda daný proces, nebo jeden ze řetězce procesů, může být spojen s izotopovým mícháním (tj. mění se poměr izotopů díky tomu, že se spojují dva nebo více celků) nebo frakcionací (v reakci je upřednostňován jeden z izotopů a produkt tak má jiné izotopové složení než zdroj reakce - substrát). [Přeneseně: Popelka frakcionovala, macecha míchala]. Pokud nedochází k izotopovému míchání nebo frakcionaci, a produkt má stejné izotopové složení jako substrát reakce nebo procesu, pak izotopové složení nemůže být použito jako izotopový indikátor, integrátor nebo archivátor. Výjimkou může být situace, kdy se v důsledku pochodu sice nemění izotopové složení látky jako celku ale mění se pozice těžšího izotopu v molekule, vzniká nový izotopomer. Na závěr jedno varování, které ponecháváme v původní řeči tak, jak bylo proneseno.

*„Warning! Stable isotope data may cause severe and contagious stomach upset if taken alone. To prevent upsetting reviewers' stomachs and your own, take stable isotope data with a healthy dose of other hydrologic, geologic, and geochemical information. Then, you will find stable isotope data very beneficial.” (Marvin O. Fretwell, pers. Comm. 1983)*

### **Vytvoř si vlastní projekt**

Pokud začínáš s izotopy, nejlepší je, když si naplánuješ svůj vlastní malý projekt, který Ti pomůže lépe pochopit práci s izotopy, hlavně úskalí výpočtů a následných interpretací; pomůže Ti uvědomit si, co všechno kromě vlastního měření izotopů potřebuješ znát a měřit.

Následuje v osmi bodech výčet toho, jak by sis měl(a) při tvorbě projektu počínat.

1. Zamysli se, co Tě zajímá. Uvědom si, že izotopy jsou všude a ve všem kolem nás a přemýšlej, jakými přeměnami procházejí a kam všude se zabudovávají v předmětu Tvého zájmu (např. v rostlině, živočichovi, půdě). Polož si konkrétní otázku, co chceš zjistit.
2. Zjisti si z literatury, zda dochází k izotopovému míchání či frakcionaci v rámci některého z procesů, které Tě zajímají. Pokud dochází k frakcionaci, zjisti si, jak je velká a jakými pravidly se řídí.
3. Udělej si přehled literatury a najdi, co všechno je známo a kdo izotopy, které Tě zajímají, používá při zkoumání podobné problematiky. Jdi na Web of

Science a pomocí klíčových slov typu „*isotope*, 13C, 15N ...“ najdi potřebné informace či kontakty.

4. Přemýšlej o pokusné ploše, kterou bys mohl(a) využít, jaké vzorky je tam možno odebírat a zda jsou to ty vzorky, jejichž analýza Ti pomůže odpovédět na položenou otázku. Pokud ne, přemýšlej o založení cíleného pokusu.

5. Najdi si izotopovou laboratoř, která může izotopový poměr změřit. Zjisti si, jak je třeba vzorek odebrat a připravit a také se nezapomeň informovat na cenu jedné analýzy. Komerční izotopové laboratoře se obvykle prezentují na internetu.

6. Kontaktuj izotopovou laboratoř nebo někoho, kdo s izotopy na podobné problematice pracuje, a prodiskutuj svou ideu. Lidé z izotopové laboratoře jsou většinou ochotni zanalyzovat několik vzorků zadarmo, zvláště pokud vidí, že jsi začátečník a máš dobrý nápad. Naopak, pokud chceš analyzovat stovky vzorků a nevíš, co od výsledků můžeš čekat, nikdo s Tebou nebude chtít nic mít. Nicméně pokud jsi bohatý(á), servisně Ti komerční laboratoře udělají téměř cokoli.

7. Odeber vzorky na základě toho, co jsi zjistil(a) v literatuře nebo v diskuzích o sledované problematice. Pokud Tě zajímá celkový izotopový poměr uhlíku v rostlinné hmotě, živočišné tkáni nebo v půdě, stačí obvykle odebrat reprezentativní vzorek, vysušit ho při 60°C a zhomogenizovat. Na vlastní analýzu je potřeba pouze malé množství vzorku, řádově ve stovkách mikrogramů až jednotkách miligramů. Při speciálních analýzách (např. analýzy specifických látek) je třeba pro extrakci látek použít laboratoří doporučené postupy. Nesmíš zapomenout, že jakákoliv neúplná extrakce s sebou nese posun v izotopovém poměru a výsledky analýz budou nepoužitelné.

8. Když dostaneš výsledky, zjisti, zda potvrzují Tvou ideu. Nezapomeň, že velmi často Ti nestačí prosté srovnání izotopového poměru v měřených vzorcích, ale pro interpretaci musíš použít další výpočty. Až dospěješ k interpretaci, diskutuj to v týmu. Pomůže Ti to pro odhalení případných chyb ve výpočtu či špatné interpretace.

Přečtení následujících stránek, které jsou věnovány problematice stabilních izotopů biogenních prvků C, O, H a N by Ti mělo pomoci při realizaci Tvého projektu a k tomu, aby ses co nejvíce vyvaroval(a) začátečnických chyb. Přejeme hodně radosti z poznávání a úspěchů při experimentech.

V Českých Budějovicích 30.11.2014

kolektiv autorů

### **Seznam literatury citované v úvodu**

FRY B. (2006) *Stable isotope ecology*. Springer, New York.

PAVLOVIČ A., SLOVÁKOVÁ L., ŠANTRŮČEK J. (2011) Nutritional benefit from leaf litter utilization in the pitcher plant *Nepenthes ampularia*. *Plant, Cell and Environment* **34**, 1865-1873.

# 1 STABILNÍ IZOTOPY – TERMINOLOGIE, ANALÝZY, PŘÍRODNÍ VÝSKYT

Jiří Květoň

## 1.1 Prvky, nuklidy, izotopy

Úvodem několik údajů ze světa atomů. Půjde o zavedení či jen připomenutí některých základních pojmů z elementární chemie.

Prvky vyskytující se ve sluneční soustavě lze uspořádat podle jistých pravidel do systému, který zavedl D. I. Mendělejev (1834 – 1907). Jednotlivé prvky jednoznačně určuje počet protonů v jádře charakterizovaný protonovým (atomovým) číslem ( $Z$ ). Zpočátku se zdálo, že hmotnosti atomů prvků jsou celočíselným násobkem hmotnosti atomu vodíku. Tak to předpokládal anglický chemik W. Prout (1785 – 1850). Pozdější výzkumy ukázaly, že tomu tak není. Hmotnost jádra, která je prakticky vyjádřením hmotnosti atomu, není téměř u žádného prvku vyjádřena celým číslem (výjimkami jsou technecium a promethium). Mohou za to další základní stavební kameny atomového jádra, neutrony, jejichž počet v jádru se značí  $N$ . Elektrony se do hmotnosti atomu nezapočítávají pro svou velmi malou hmotnost ve srovnání s jádrem – klidovou hmotnost mají skoro 2 000 krát menší. Neutrony mají přibližně stejnou hmotnost jako protony, ale na rozdíl od protonů, které mají kladný náboj, jsou elektricky neutrální. Jádro každého prvku tak charakterizují tři čísla:

$Z$  – protonové číslo - jednoznačně určující prvek

$N$  – neutronové číslo

$A$  – hmotové (nukleonové) číslo, které je dáno součtem protonů a neutronů:  $A = Z + N$

Čísla  $A$  a  $Z$  se pak u značky prvku píší následovně:  ${}^A_ZX$ .

Na rozdíl od  $Z$ , které je pro každý prvek jedinečné, může  $N$  a v důsledku toho i  $A$  prvku nabývat různých hodnot. Jednotlivé prvky jsou tak tvořeny atomy s různým počtem neutronů a to v různém relativním zastoupení v rámci všech jader daného prvku. Z toho pak přímo vyplývají už zmíněné neceločíselné relativní atomové hmotnosti drtivé většiny všech přirozeně se vyskytujících prvků.

Atomy se kategorizují na základě variability v zastoupení jednotlivých nukleonů (protonů a neutronů) v jádře:

**Nuklid:** Prvek (charakterizovaný daným počtem protonů) s konkrétním počtem neutronů. Příklad:  ${}^1_1\text{H}$ ,  ${}^{13}_6\text{C}$ .

**Izotopy:** Atomy prvku lišící se počtem neutronů. Je možno je také nazývat **izotopické nuklidy**. Příklad:  ${}^1_1\text{H}$ ,  ${}^2_1\text{H}$  (stabilní, nazývaný deuterium),  ${}^3_1\text{H}$  (radioaktivní, nazývaný tritium). Jsou to jaderná individua s rozdílnými jadernými a fyzikálně-chemickými vlastnostmi vyvolanými odlišným počtem neutronů v jádře, a tím pádem změněnou hmotností jádra (obr. 1.1.1).

Za chemické chování prvku, tj. za konkrétní chemické reakce a schopnost vytvářet konkrétní sloučeniny, je zodpovědný elektronový obal atomu, neboť právě elektrony vytvářejí vazby mezi prvky ve sloučeninách. Různé izotopy téhož prvku vstupující do

reakce mohou její průběh ovlivňovat z kinetického hlediska (především rychlost reakce), nikoliv však z hlediska schopnosti izotopu vstoupit do dané reakce.<sup>1</sup>

Všechny existující prvky mohou být buď **stabilní** anebo **radioaktivní**. Jádra radioaktivních prvků se samovolně rozpadají a emitují radioaktivní záření (částice), přičemž zpravidla dochází k přeměně jednoho prvku v prvek jiný podle jistých pravidel. Kritériem stability je poločas rozpadu (doba, během níž dojde k rozpadu pravděpodobně poloviny počátečního počtu jader), který musí být delší než  $10^{18}$  roků. Takto dlouhý poločas rozpadu je totiž limitem současné měřicí techniky a metod pro detekci radioaktivního rozpadu. Z tohoto pohledu existuje asi 120 prvků, které jsou zastoupeny více jak 3 000 nuklidů, přičemž stabilních nuklidů je 254 (údaj platný koncem roku 2014 a získaný z anglicky psané mutace Wikipedie). Na základě výsledků pokusů byla pro existenci stabilních nuklidů stanovena pravidla (Cabicar 1983), z nichž některá si pro zajímavost uvedeme:

1. U všech prvků s výjimkou  ${}^1_1\text{H}$  a  ${}^3_2\text{He}$  je poměr  $A/Z \geq 2$ , což znamená, že  $N \geq Z$ . Se stoupajícím  $A$  roste  $A/Z$  až k hodnotě 2,5.
2. Největší počet stabilních nuklidů mají jádra se sudými  $Z$ ,  $N$  i  $A$ . Naopak nejmenší počet stabilních nuklidů má jádra s lichými  $Z$  a  $N$ , a tím pádem sudým  $A$ .
3. Každý prvek s lichým  $Z < 82$  je zastoupen nejméně jedním a nejvýše dvěma stabilními izotopy (Astonovo pravidlo). Výjimkami jsou technecium a promethium, které nemají stabilní nuklidy (pouze radioaktivní).
4. Každý prvek s  $A < 209$  má alespoň jeden stabilní nuklid. Výjimkami jsou prvky s  $A = 5, 8, 98$  a  $147$ , které buď neexistují (nuklid s  $A = 5$ ) nebo jsou radioaktivní.
5. Prvky se  $Z > 83$  a  $A > 209$  nemají žádný stabilní nuklid. Všechny jsou radioaktivní.

---

<sup>1</sup> Pro úplnost bude užitečné uvést ještě další kategorie jader prvků charakterizovaných různými kombinacemi počtu nukleonů, i když se s těmito pojmy v oborech zabývajících se stabilními izotopy lehkých prvků setkáváme zřídka.

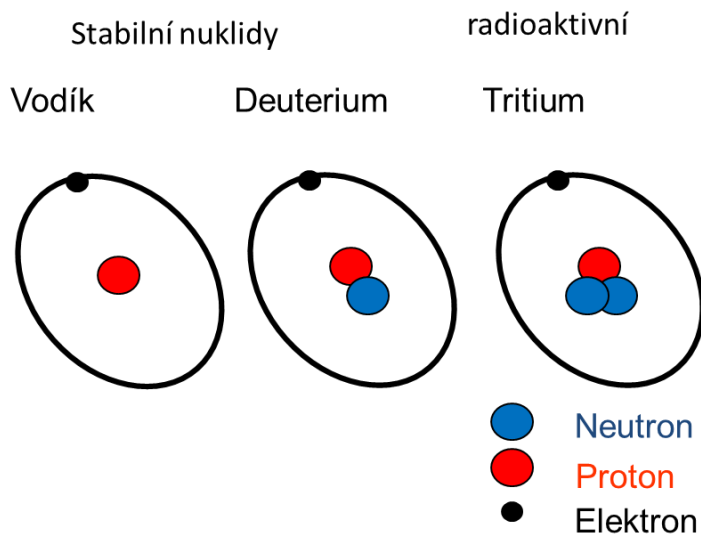
*Izobary*: Nuklidů různých prvků mající shodné hmotnostní číslo ( $A$ ). Z toho plyne, že protony a neutrony jsou v jádrech různě zastoupeny. Příklad:  ${}^{36}_{16}\text{S}$ ,  ${}^{36}_{18}\text{Ar}$ .

*Izotony*: Nuklidů různých prvků mající shodný počet neutronů. Příklad:  ${}^{26}_{12}\text{Mg}$ ,  ${}^{27}_{13}\text{Al}$ .

*Izodiasféry*: Nuklidů různých prvků mající shodný přebytek neutronů nad dvojnásobkem počtu protonů, tj.  $\Delta N = A_1 - 2Z_1 = A_2 - 2Z_2$ . Příklad:  ${}^3_1\text{H}$  (radioaktivní),  ${}^7_3\text{Li}$ .

*Izomery*: Nuklidů jednoho prvku mající různý energetický stav jádra, a tím pádem může být jeden nuklid radioaktivní a druhý stabilní. Příklad:  ${}^{137m}_{56}\text{Ba}$  (radioaktivní),  ${}^{137}_{56}\text{Ba}$  (stabilní).





${}^1_1\text{H}$  a deuterium  ${}^2_1\text{H}$   ${}^3_1\text{H}$   ${}^3_1\text{H}$

## 1.2 Analýzy stabilních izotopů

Z toho nejobecnějšího hlediska lze analýzy stabilních izotopů využít v oblastech:

- I. Přesné stanovení hmotnosti určitého izotopu a stanovení jeho absolutního zastoupení.
- II. Vyšetřování přítomnosti určitého izotopu v konkrétním místě molekuly.
- III. Určení izotopického složení vzorku a jeho změn.

V této publikaci se budeme zabývat postupy spadajícími do III. oblasti uvedeného rozdělení, protože stanovení izotopického složení vzorků a jeho změn, ke kterým dochází při procesech zahrnujících biologické systémy, je hojně využíváno v biochemických a biologických vědách.

Z hlediska fyzikálních principů, na nichž jsou analýzy založeny, pak dělení analýz vypadá následovně:

1. Hmotnostní spektrometrie.
2. Nespecifické metody.
3. Specifické metody.

Nespecifické metody zahrnují katarometrii (využití tepelné vodivosti plynů), refraktometrii, interferometrii, elektrochemii a hustotové metody. Mezi specifické metody patří plynová chromatografie, spektroskopie a jaderné metody. Nicméně ve vědách o živé přírodě je nejvíce využívána hmotnostní spektrometrie.

### 1.2.1 Hmotnostní spektrometrie

Významné postavení v souboru metod uplatňujících se v oboru analýzy stabilních izotopů zaujímá izotopová poměrová hmotnostní spektrometrie (v literatuře se můžete setkat se zkratkou IRMS, což je z anglického *Isotope Ratio Mass Spectrometry*). Tyto metody musí být velmi přesné a přístroje velmi citlivé, neboť se jimi detegují rozdíly v hmotnostech molekul lišících se izotopicky u jednoho prvku často jen o jeden neutron. Pro biologické aplikace je typickým příkladem uhlík (izotopy  $^{12}_6\text{C}$  +  $^{13}_6\text{C}$ ), kde v rámci analyzované látky (analytu), jímž je  $\text{CO}_2$ , je molekula  $^{13}_6\text{CO}_2$  jen o ~ 2,27 % těžší než molekula  $^{12}_6\text{CO}_2$ . Směrem k těžším prvkům (tj. prvkům obsahujícím více nukleonů v jádře) se toto procento dále snižuje. Molekulám stejného chemického složení, ale lišícím se izotopickým složením (např. výše uvedené  $^{12}_6\text{C}^{16}_8\text{O}^{16}_8\text{O}$  a  $^{13}_6\text{C}^{16}_8\text{O}^{16}_8\text{O}$ ), se říká **izotopology**.



Přístroj pro měření relativního zastoupení izotopů pomocí IRMS se nazývá **hmotnostní spektrometr**. Jeho hlavními funkčními částmi jsou iontový zdroj, analyzátor s iontooptickým systémem a detektor. Celé zařízení je tvořeno ještě vakuovým systémem, elektronickým řídicím systémem ovládaným počítačem a periferními zařízeními sloužícími pro přípravu a dávkování vzorků. Jeden takový přístroj pro analýzu stabilních izotopů biogenních prvků vodíku, uhlíku, dusíku, kyslíku a síry pracující v módu „nepřetržitého toku“ (*continuous flow*) si popíšeme. Fotografie přístroje je zachycena na obr. 1.2.1.1.

Všechny vzorky k analýze musí být v plynném skupenství. Pokud se tedy nejedná o vzorky, které jsou už samy o sobě v plynné formě, je zapotřebí pevné a kapalné vzorky do plynného stavu převést. U dvou typů periférií, v nichž k tomu dochází, je společným jmenovatelem působení vysokých teplot. Anorganické i organické látky pevného či kapalného skupenství obsahující vodík, uhlík nebo dusík se spalují v proudu kyslíku v katalytických kolonách za vzniku příslušných oxidů, které jsou dále upravovány do chemické formy předepsané pro analyt. Vzorky, ať už pevné nebo kapalné, u nichž je

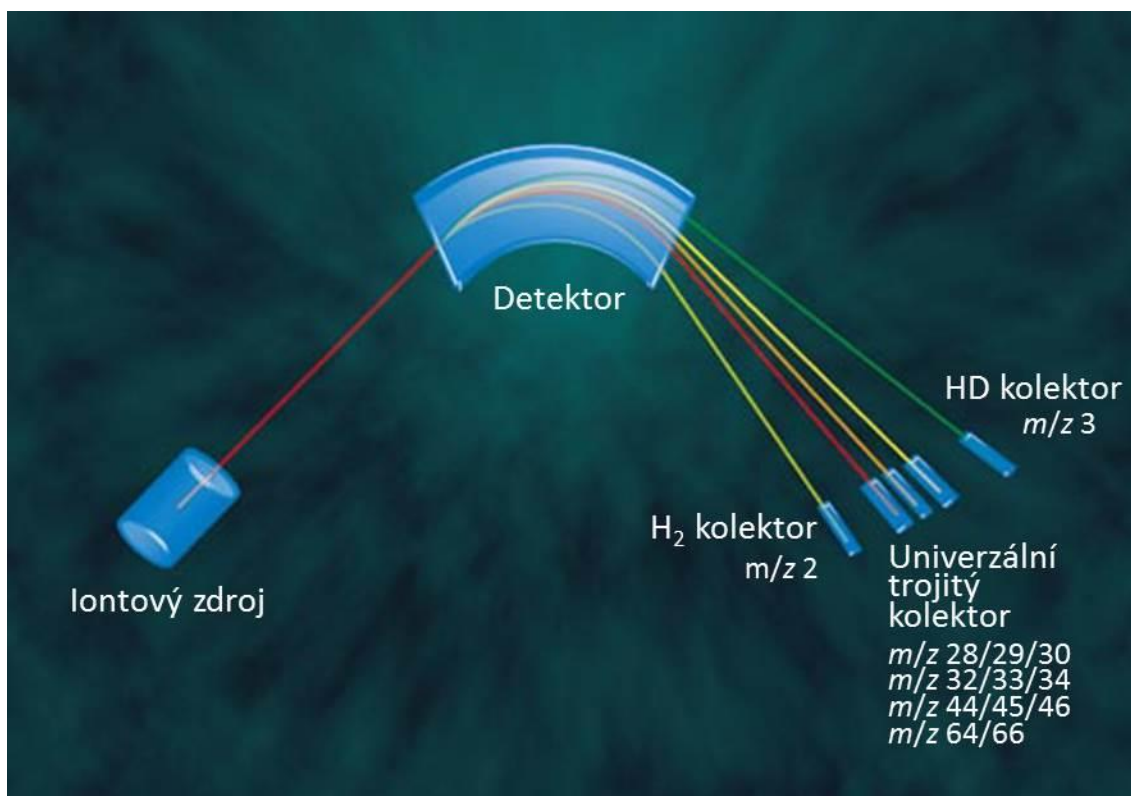
zapotřebí stanovit stabilní izotopy kyslíku, a tudíž spalování v atmosféře kyslíku nepřichází v úvahu, neboť izotopový signál kyslíku ze vzorku by byl překryt mnohonásobně silnějším signálem kyslíku pro spalování, se rozkládají na plynné složky vysokoteplotní (~ 1 400 °C) konverzí. Třetí možností, jak převést pevné nebo kapalné vzorky do plynného skupenství, je chemický rozklad. Tato metoda se uplatňuje především při analýzách stabilních izotopů uhlíku u nespalitelných vzorků (tj. takových, které obsahují sloučeniny, kde je již uhlík ve svém nejvyšším možném oxidačním stupni), z nichž se uvolňuje CO<sub>2</sub>. Takové jsou uhličitany, kde se jako rozkladného činidla používá bezvodá kyselina trihydrogenfosforečná (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). V tab. 1.2.1.1 jsou uvedeny stabilní izotopy, které lze hmotnostním spektrometrem stanovit, a k nim příslušné plynné analyty.

Tab. 1.2.1.1 Chemická forma stabilních izotopů stanovitelných izotopovým poměrovým hmotnostním spektrometrem Thermo Finnigan DELTAplus XL

Izotopy	${}^2_1\text{H}/{}^1_1\text{H}$	${}^{13}_6\text{C}/{}^{12}_6\text{C}$	${}^{15}_7\text{N}/{}^{14}_7\text{N}$	${}^{18}_8\text{O}/{}^{16}_8\text{O}$	${}^{34}_{16}\text{S}/{}^{32}_{16}\text{S}$
Analyty	H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	CO	SO <sub>2</sub>

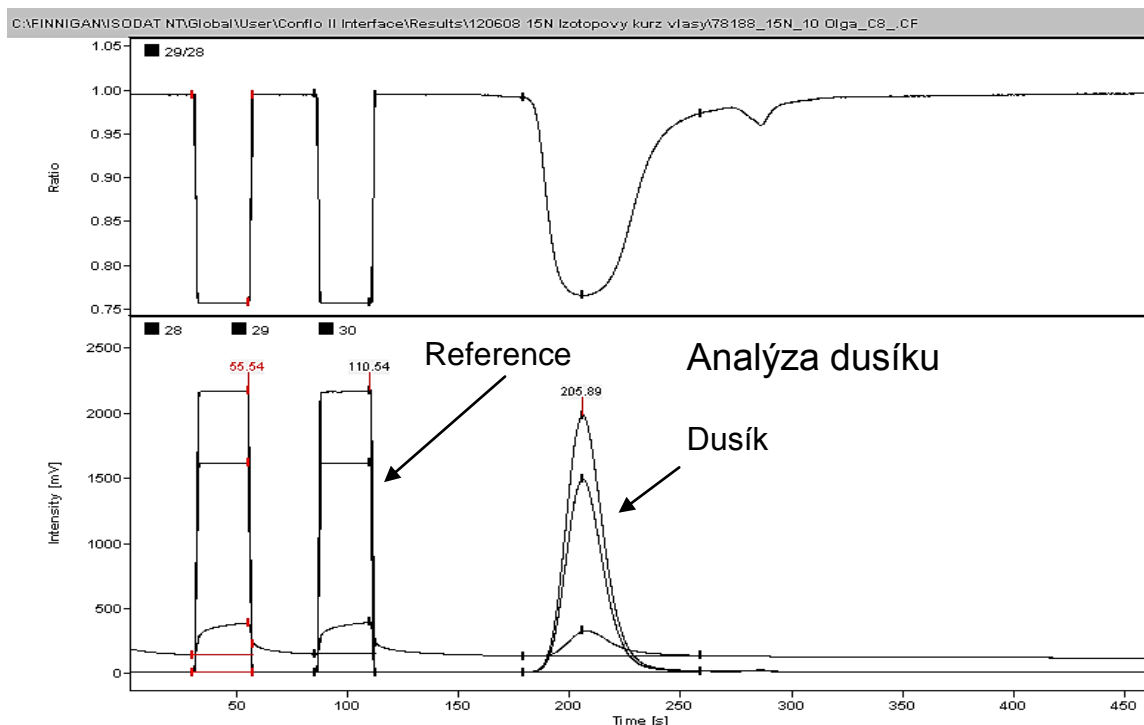
Periferie jsou s vlastním hmotnostním spektrometrem propojeny kovovými (nerezovými) a skleněnými kapilárami přes mezičlen („interface“), v němž se vzorek dávkuje pro vstup do komory analyzátoru. Tento mezičlen také slouží ke střídání toku vzorku a reference k analýze. Referencí je chemicky totožný plyn jako analyt, ovšem o známém izotopovém složení. Reference se proto také nazývá pracovní standard. Celým systémem zařízení protéká nosný plyn, kterým je chemicky inertní helium.

Molekuly analytu vstupující do iontového zdroje jsou bombardovány elektrony emitovanými žhaveným wolframovým vláknem. Tyto primární elektrony vyrážejí z vnějších molekulárních orbitalů další elektrony, a vytvářejí tak kladně nabitě ionty. Vzniklé kationty jsou urychleny vysokým napětím až na 3 keV a fokusovány elektronovou optikou a výstupní štěrbínou do úzkého svazku. Urychlený tok iontů pak vstupuje do magnetického pole vytvářeného elektromagnetem, v němž dochází k zakřivení drah iontů v závislosti na měrném náboji – poměru hmotnosti iontu a jeho náboje –  $m/z$ . Tím se od sebe separují ionty různých hmotností a nábojů, které se pak odděleně zaznamenávají detektorem (obr. 1.2.1.2). Proud iontů se tak přeměňuje na elektrickou odezvu úměrnou množství iontů daného měrného náboje. Detektorem bývá soustava elektrostatických Faradayových kolektorů. Hmotnostní spektrometry mohou být osazeny různými typy a kombinacemi detektorů, např. dvěma kolektory pro analýzu izotopů vodíku a univerzálním trojitým kolektorem – viz obr. 1.2.1.2. Trojitý detektor se patřičným nastavením intenzity magnetického pole naladí na hmotnosti analyzovaných izotopů. Činnost hmotnostního spektrometru včetně periferií je řízena počítačem prostřednictvím software dodávaného výrobcem. Výstupem může být buď hmotnostní spektrum v závislosti na měrném náboji, nebo chromatogram, z něhož se určuje kvantitativní zastoupení analyzovaných izotopů. Příklad takového chromatogramu je uveden na obr. 1.2.1.3.



11.

Komora analyzátoru s iontovým zdrojem je evakuována, protože dráha pohybu kationtů k detektoru nesmí být ovlivněna jejich interakcemi s molekulami prostředí. Nárazy elektronů by navíc vytvářely kationty nejen z molekul analytu, ale také z molekul prostředí, což by vedlo k nepřipustnému zkreslování výsledků. Snížení tlaku na velmi malé hodnoty je zprostředkováno dvoustupňovým vakuovým systémem. V prvním stupni se olejovou rotační vývěvou docílí předvakua řádově asi  $10^{-3}$  Pa. Ve druhém stupni se lopatkovými turbomolekulárními pumpami dosáhne v analyzátoru při uzavřeném vstupu tlaku jen  $10^{-8}$  Pa. Po otevření vstupu (při měření) stoupne tlak díky proudícímu nosnému heliu na provozních  $10^{-6}$  Pa.



Stabilní izotopy jakéhokoli prvku nejsou v přírodě zastoupeny rovnoměrně. U biogenních prvků (vodík, uhlík, dusík a kyslík) a také u síry platí, že těžší izotopy jsou výrazně minoritní (viz tab. 1.2.1.2). V případě, že by se hmotnostním spektrometrem se zesílením nastaveným na přirozený výskyt izotopů měly měřit vzorky obohacené původně minoritním izotopem jako značkou, nebylo by to možné, protože přístroj nastavený na vyšší citlivost by byl signálem zahlcen. U hmotnostních spektrometrů se proto už při jejich výrobě nastavuje zesílení detektorů pro jednotlivé izotopy podle toho, v rámci jakého rozsahu četností daných izotopů se bude přístroj používat.

Tab. 1.2.1.2 Zastoupení stabilních izotopů biogenních prvků a síry v přírodě (označované také jako zastoupení stabilních izotopů v pozadí)

Izotopický nuklid	$^1_1\text{H}$	$^2_1\text{H}$	$^{12}_6\text{C}$	$^{13}_6\text{C}$	$^{14}_7\text{N}$	$^{15}_7\text{N}$	$^{16}_8\text{O}$	$^{18}_8\text{O}$	$^{32}_{16}\text{S}$	$^{34}_{16}\text{S}$
Zastoupení [%]	99,985	0,015	98,89	1,11	99,64	0,36	99,76	0,20	95,00	4,22

### 1.2.2 Optická spektroskopie

Ze specifických metod používaných v izotopovém výzkumu v biologických vědách stojí za zmínku absorpční spektroskopie. Spektroskopické metody tohoto druhu jsou založeny na optických vlastnostech izotopologů, které mají velmi málo, ale měřitelně, vůči sobě posunuté absorpční pásy záření. Přístroje – spektrometry – mají jako zdroj záření laser schopný velmi rychlého přeladění mezi absorpčními maximy analyzovaných izotopologů. Tímto způsobem je možno proměřovat vzorek s velkou frekvencí – mnohokrát za sekundu.

Hmotnostní spektrometrie zůstává v současné době (2. dekáda 21. století) prioritní metodou pro měření pevných a kapalných vzorků a taky volbou z důvodů vyšší přesnosti a stability přístrojů. Nicméně metody laserové spektroskopie se již teď úspěšně uplatňují při analýzách plyných vzorků v těch případech, kde je výhodou rychlost měření a mohou se tak studovat vysoce dynamické procesy, případně kdy je žádoucí analyzovat vzorky přímo v terénu. Laserové spektrometry jsou relativně malé, nepotřebují zařízení pro zajištění vakua ani separační techniky pro vydělení žádané látky. Mohou přímo analyzovat plyné izotopology při jejich běžné (atmosférické) koncentraci a nevyžadují tudíž žádné techniky pro zakoncentrování analytu na požadovanou hodnotu.

### 1.3 Vyjadřování izotopového složení látek a jeho změn

#### 1.3.1 Přirozený výskyt stabilních izotopů

Prvotní veličinou definovanou pro kvantifikaci stabilních izotopů je **izotopový poměr**, tj. poměr četnosti minoritního (zpravidla těžšího) izotopu k četnosti majoritního (zpravidla lehčího) izotopu, značený  $R$ :

$$R = (\text{četnost minoritního izotopu}) / (\text{četnost majoritního izotopu}) [-]^2 \quad 1.3.1.1$$

Četnost může být vyjádřena v jednotkách hmotnosti, látkového množství, počtu částic či v jiných vhodných jednotkách vyjadřujících množství izotopů v dané látce. Veličina  $R$  je v každém případě bezrozměrná. Vycházíme-li z přirozeného výskytu stabilních izotopů v přírodě, není jejich kvantifikace v absolutní míře v jakýchkoliv jednotkách vyjadřujících množství ani s využitím poměru  $R$  vhodná z toho důvodu, že zastoupení minoritního izotopu je opravdu velmi malé, u biogenních prvků nejvíce kolem 1 %. Proto bylo pro izotopové složení látek a jejich změny navrženo relativní vyjádření izotopového zastoupení (Urey 1948). Relativní v tomto smyslu znamená vzhledem ke standardu. Značí se  $\delta$  a je dáno výrazem:

$$\delta = [(R_{vz} - R_s) / R_s] \cdot 1000 [\text{‰}] \quad 1.3.1.2$$

$R_{vz}$  a  $R_s$  představují izotopové poměry u vzorku a standardu; násobení 1000 převádí výsledek na promile (McKinney *et al.* 1950). Veličina označovaná jako  $\delta$  bohužel dodnes nemá svůj všeobecně přijímaný název! Vzhledem k matematické konstrukci výrazu by tato veličina mohla být nazývána **poměrné izotopové složení**.

Vztah 1.3.1.2 udává, jak se izotopový poměr zkoumané látky liší od izotopového poměru mezinárodně uznaného standardu (tab. 1.3.1.1, Fry 2006).

$\delta > 0$  znamená, že ve vzorku je více minoritního izotopu než ve standardu a vzorek je o minoritní izotop ve srovnání se standardem **obohacen**

$\delta < 0$  znamená, že ve vzorku je méně minoritního izotopu než ve standardu a vzorek je o minoritní izotop ve srovnání se standardem **ochuzen**

$\delta = 0$  znamená, že ve vzorku je přesně tolik minoritního izotopu jako ve standardu.

Každá dvojice izotopů má svůj standard. Jako standardy byly zvoleny přírodní látky, které jsou izotopově homogenní a nepodléhají ani pomalým chemickým změnám. Množství takovýchto přírodnin je ovšem omezené, a tak jsou v dnešní době už některé z nich vyčerpány. Místo vyčerpáných standardů byly v koordinaci s Mezinárodní

<sup>2</sup> znaky [-] označují bezrozměrnou veličinu

agenturou pro atomovou energii (Atomovou agenturou) ve Vídni připraveny standardy nové o shodném izotopovém složení jako standardy původní. Nové standardy mají proto před zkratkou svého názvu předřazeno písmeno „V“ podle počátečního písmene „Vienna“ – Vídeň.

Tab. 1.3.1.1: Izotopové poměry  $R$  mezinárodních standardů stabilních izotopů

Mezinárodní název standardu	Označení	Izotopy	$R$ [-]
Standard Mean Ocean Water	SMOW	$^2_1\text{H}/^1_1\text{H}$	$1,5576 \cdot 10^{-4}$
		$^{18}_8\text{O}/^{16}_8\text{O}$	$2,0052 \cdot 10^{-3}$
PeeDee Belemnite	PDB	$^{13}_6\text{C}/^{12}_6\text{C}$	$1,1180 \cdot 10^{-2}$
		$^{18}_8\text{O}/^{16}_8\text{O}$	$2,0672 \cdot 10^{-3}$
Air	AIR	$^{15}_7\text{N}/^{14}_7\text{N}$	$3,6765 \cdot 10^{-3}$
Canyon Diablo Troilite	CDT	$^{34}_{16}\text{S}/^{32}_{16}\text{S}$	$4,41626 \cdot 10^{-2}$

Rychlosti chemických reakcí a transportu molekul závisí mimo jiné také na hmotnosti jader a různě těžké izotopy v molekulách reaktantu proto tyto rychlosti ovlivňují. Odchylka v rychlostech reakce (nebo transportu), které se účastní lehčí nebo těžší molekuly je příčinou **izotopového efektu** tj. skutečnosti, že produkt reakce nebo látka na konci transportní dráhy má jiné složení než substrát reakce nebo látka na začátku dráhy. Vlivem izotopových efektů není přirozený výskyt prakticky žádných izotopů účastnících se geochemických a biologických procesů uniformní, mění se v čase i prostoru. Pro studium dynamiky přirozeného výskytu je tedy potřeba izotopový efekt definovat kvantitativně.<sup>3</sup>

Vyjádříme velikost izotopového efektu  $\alpha$  poměrem izotopového složení výchozí látky (reaktantu) a produktu reakce:

$$\alpha = R_r / R_p \quad 1.3.1.3$$

$R_r$  a  $R_p$  jsou po řadě izotopové poměry u reaktantu a produktu. Izotopový efekt je tedy poměrem izotopových poměrů. Poskytuje nám údaje o procesech, v nichž dochází k izotopovému třídění (frakcionaci), procesu opačnému k mísení. Biologické i fyzikální systémy a reakce v nich jsou poměrně málo citlivé na hmotnost molekul. Izotopový efekt  $\alpha$  je proto desetinné číslo velmi blízké číslu 1. Ukázalo se jako názornější a užitečné zavést odvozenou veličinu nazývanou **izotopová diskriminace** jako odchylku ( $\Delta$ ) izotopového efektu  $\alpha$  od jedničky a označovanou symbolem  $\Delta$ :

$$\Delta = (\alpha - 1) \cdot 1000 [\text{‰}] \quad 1.3.1.4$$

Po dosazení za  $\alpha$  dostaneme výraz formálně matematicky shodný s výrazem 1.3.1.2 pro výpočet  $\delta$ :

<sup>3</sup> Bohužel ve vědecké komunitě nepanuje jednota názorů, jak některé vztahy definovat, ani jak zavedené veličiny pojmenovat. Abychom nepřispívali k šíření chaosu, nebudeme se snažit vymýšlet vlastní nomenklaturu, ale jako nejvhodnější pro výklad v dalších kapitolách zvolíme a budeme respektovat konvenci zavedenou v publikaci Farquhar *et al.* (1989) a používanou v současnosti v převážné většině rostlinné fyziologické a ekologické literatury.

$$\Delta = [(R_r - R_p) / R_p] \cdot 1000 [\text{‰}] \quad 1.3.1.5$$

Na rozdíl od poměrného izotopového složení  $\delta$ , které nám udává relativní odchylku izotopového složení vzorku od standardu, izotopová frakcionace  $\Delta$  vyjadřuje izotopovou změnu během procesu (reakce). Je proto častěji používána např. v biologii nebo chemii, kde se posuzují procesy a reakce a jejich izotopový výsledek.

Izotopová diskriminace  $\Delta$  byla jako veličina zavedena při zkoumání izotopových efektů při fotosyntetické fixaci  $\text{CO}_2$ , kdy téměř všechny dílčí procesy znevýhodňují (diskriminují) izotop  $^{13}\text{C}$ . Produkt (rostlina) je proto vždy ochuzen o  $^{13}\text{C}$  proti reaktantu (substrátu, kterým je atmosférické  $\text{CO}_2$ ) a  $\Delta$  má tedy kladnou hodnotu ( $R_r > R_p$ ). Z rovnice 1.3.1.5 tedy vyplývá, že:

$\Delta > 0$  znamená, že produkt je ochuzen o minoritní (těžší) izotop;

$\Delta < 0$  znamená, že produkt je obohacen o minoritní (těžší) izotop<sup>4</sup>.

Matematickými úpravami můžeme dojít ke vzájemnému vztahu izotopové diskriminace  $\Delta$  a poměrného izotopového složení reaktantu a produktu  $\delta_r$  a  $\delta_p$ :

$$\Delta = (\delta_r - \delta_p) / [1 + (\delta_p / 1000)] [\text{‰}] \quad 1.3.1.6$$

Výraz se významně zjednoduší, když je  $\delta_p$  v absolutní hodnotě „malé“ číslo vzhledem k číslu 1000. Tento požadavek bývá většinou v chemických a biologických systémech splněn. V takovém případě je zlomek ve jmenovateli výrazu zanedbatelně malé číslo ve srovnání s číslem 1 a můžeme jej pominout. Výraz se tak zjednoduší do tvaru

$$\Delta = \delta_r - \delta_p [\text{‰}] \quad 1.3.1.7$$

a umožňuje získat jednoduchý odhad izotopové frakcionace odečtením poměrného izotopového složení produktu od poměrného izotopového složení výchozích látek. Například, je-li produkt ochuzený o minoritní izotop ve srovnání s výchozím reaktantem,  $\delta_p$  bude menší než  $\delta_r$  a  $\Delta$  bude kladné číslo a to i v případě, že  $\delta_r$  i  $\delta_p$  budou záporná čísla. Během reakce tak došlo k diskriminaci minoritního izotopu.

### 1.3.2 Značení stabilními izotopy

Používají-li se stabilní izotopy ke značení látek, aby se mohly sledovat jejich osudy ve fyzikálních a chemických procesech, ale především v živých systémech, není popis založený na prostém izotopovém poměru  $R$  a poměrném izotopovém složení  $\delta$  vhodný. V takových případech bývá přirozeně se vyskytující minoritní izotop v nadbytku a  $\delta$  pak nabývá vysokých až velmi vysokých hodnot, řádově až desetitisíců, což je nežádoucí. Místo toho se proto používá veličina popisující procentuální zastoupení minoritního stabilního izotopu ve vzorcích. Z jejího anglického označení se vžil název **atomprocento**, značí se  $A^5$  a je definováno:

$$A = (\text{četnost minorit. izotopu}) / (\text{četnosti minorit. + majorit. izotopu}) \cdot 100 [\%] \quad 1.3.2.1$$

Je to klasický vzorec pro výpočet procent. Přestože je výše uvedeno, že poměrné izotopové složení  $\delta$  není vhodnou veličinou pro popis látek obohacených o minoritní stabilní izotopy, bude užitečné si matematický vztah dávající do souvislosti atomprocento  $A$  a poměrné izotopové složení  $\delta$  uvést:

$$A = 100 \cdot R_s (\delta + 1000) / [R_s (\delta + 1000) + 1000] [\%] \quad 1.3.2.2$$

<sup>4</sup> Záporná diskriminace neboli obohacení je lingvisticky protimluv. Je třeba vnímat slovo „diskriminace“ jako název veličiny spíše než označení procesu.

<sup>5</sup> Často lze v literatuře nalézt pro jednotky atomprocenta označení at% (viz také kapitola 3)



$R_s$  představuje izotopový poměr patřičného standardu. Jak vyplývá z rovnice 1.3.2.2, vztah  $A$  a  $\delta$  není lineární. Nelinearita se projevuje zvláště při vysokých hodnotách  $\delta$ .

Pro úplnost si ještě zadefinujeme veličinu, která je doplňková k atomprocentu a udává procentuální nadbytek minoritního izotopu nad jeho zastoupením v pozadí. Tato veličina je nazvána **atomprocentický nadbytek** (anglicky *atompercent excess*), značí se  $E$  a je dána vztahem:

$$E = A - B [\%] \quad 1.3.2.3$$

$B$  zde v procentech vyčísluje přítomnost daného minoritního izotopu v pozadí. Tyto hodnoty jsou pro některé prvky uvedeny v tab. 1.2.1.2. Po dosazení za  $A$  ze vzorce 1.3.2.2 dostáváme rovnici pro výpočet atomprocentického nadbytku  $E$  s využitím  $\delta$ :

$$E = 100 \cdot R_s (\delta + 1000) / [R_s (\delta + 1000) + 1000] - B [\%] \quad 1.3.2.4$$

Na závěr této kapitoly si ještě všimněme vztahu 1.3.2.1, jestliže z něj vypustíme násobení číslem 100. Pak dostaneme výraz nazývaný **frakční zlomek** a označovaný  $F$ :

$$F = (\text{četnost minorit. izotopu}) / (\text{četnosti minorit. + majorit. izotopu}) [-] \quad 1.3.2.5$$

Výsledky výpočtů frakčního zlomku  $F$  a izotopového poměru  $R$  (výraz 1.3.1.1) mohou být číselně dosti podobné a to tím více, čím je v dané látce menší četnost minoritního izotopu. Nicméně podle příslušných definic se jedná o dvě různé veličiny, mezi nimiž lze odvodit vzájemné matematické souvislosti<sup>6</sup>:

$$F = R / (1 + R) [-] \quad 2.3.2.6$$

$$R = F / (1 - F) [-] \quad 2.3.2.7$$

## 1.4 Seznam použité literatury

- BROŽ J., ROSKOVEC V., VALOUCH M. (1980) 98. Nuklidy. In: *Fyzikální a matematické tabulky*, Nakladatelství technické literatury, Praha. 152-168.
- CABICAR J. (1983) Vlastnosti stabilních izotopů a jejich význam. In: *Stabilní izotopy*, Academia, Praha. 13-28.
- FARQUHAR G. D., EHLERINGER J. R., HUBICK K. T. (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 503-537.
- FRY B. (2006) Isotope notation and measurement. In: *Stable isotope ecology*. Springer, New York. 1-39.

<sup>6</sup> V případě, že budeme při odvozování vzájemných vztahů vycházet z atomprocenta  $A$  místo z frakčního zlomku  $F$ , obdržíme pro vyjádření vzájemného vztahu mezi  $A$  a  $R$  analogicky k vzorcům 1.3.2.6 a 1.3.2.7 vzorce  $A = R / (1 + R) \cdot 100 [\%]$  a  $R = A / (100 - A) [-]$ .

- MCKINNEY C. R., MCCREA J. M., EPSTEIN S., ALLEN H. A., UREY H. C. (1950) Improvements in mass spectrometers for the measurement of small differences in isotope abundance ratios. *Rev. Sci. Instrum.* **21**, 724-730.
- UREY H. C. (1948) Oxygen isotopes in nature and in the laboratory. *Science* **108**, 489-496.

## I. UHLÍK

### 2 FRAKCIONACE IZOTOPŮ UHLÍKU PŘI FOTOSYNTÉZE ANEB PROČ JSME OCHUZENI O TĚŽKÝ IZOTOP UHLÍKU?

Jiří Šantrůček

#### 2.1 Vysvětlení na úvod a trocha historie

Stručná odpověď na otázku v názvu kapitoly může být: protože uhlík, který je v našem těle prošel nějakým procesem, který diskriminoval těžší izotop uhlíku  $^{13}\text{C}$  a dával přednost lehčímu izotopu  $^{12}\text{C}$ . Ještě než budeme pátrat po tom, co tím procesem je, musíme doplnit ne zcela přesně formulovanou úvodní otázku. Ochuzení ve srovnání s čím? Asi každý i jen v základech biologie vzdělaný člověk dnes ví, že zdrojem všeho organického uhlíku, a tedy i toho v našich tělech, je oxid uhličitý ( $\text{CO}_2$ ), který je v atmosféře a který se stal organickým díky fotosyntéze. Tedy otázka by měla správněji znít „Proč je uhlík v mém těle relativně ochuzen o izotop  $^{13}\text{C}$  proti uhlíku v atmosféře Země?“. Nalézt odpověď vyžaduje jít zpět v našem potravním řetězci a stopovat jak to vypadá s relativním obsahem  $^{13}\text{C}$  v našem jídle, v jídle našeho jídla, ... Takovým procesem bychom dospěli k závěru, že k podstatnému ochuzení došlo už na samém začátku potravního řetězce tj. při asimilaci  $\text{CO}_2$  rostlinami. Další články potravního řetězce a procesy v něm, např. trávení a dýchání býložravců (herbivorů), masožravců (karnivorů) i naše fyzikální postupy při úpravě stravy už relativní obsah  $^{13}\text{C}$  zásadně nezměnily. A protože „všechno maso bylo dříve tráva“, a současně „izotopově jsme to, co jíme“ (s jen malou změnou) i naše svaly, kosti i nehty nesou izotopový podpis diskriminačního procesu, který se udal v rostlinách už na samém začátku při zabudování uhlíku z  $\text{CO}_2$  do organických látek, do jednoduchých tříuhlíkatých cukrů. Tomuto procesu se říká fotosyntetická asimilace uhlíku, zkráceně fotosyntéza.

Každá záležitost, kterou se snažíte pochopit v detailech, se ukáže složitější, než byla na první pohled, strukturovaná a propojená vazbami. Podobně i diskriminace uhlíku při fotosyntéze. Nejen, že existují dva až tři z izotopového (i fyziologicko-biochemického) hlediska odlišné typy fotosyntézy suchozemských rostlin; i příčin, které vedou k diskriminaci  $^{13}\text{C}$  je několik a kombinují se. V této kapitole bychom vás rádi přivedli srozumitelnou formou k jejich pochopení, a tedy schopnosti porozumět nerůznějším aplikacím, které se od diskriminace uhlíku při fotosyntéze odvíjejí.

Trochu paradoxně, k tomu nejzásadnějšímu biologickému pozorování v oblasti frakcionace  $^{13}\text{C}$  dospěli fyzikové už koncem 30-tých let minulého století, jakmile se jim podařilo zkonstruovat dostatečně citlivý poměrový hmotový spektrometr (IRMS). Analýzami kousků rostlinných pletiv zjistili pozoruhodnou věc, totiž, že hmota rostlinného těla je (téměř) vždy ochuzena o izotop  $^{13}\text{C}$  ve srovnání s relativním zastoupením  $^{13}\text{CO}_2$  v atmosféře, z které rostliny  $\text{CO}_2$  čerpaly. Například, kdybyste si „nachytali“ náhodně 100 tisíc molekul  $\text{CO}_2$  z volné atmosféry a roztřídili je na  $^{12}\text{CO}_2$  a  $^{13}\text{CO}_2$ , zjistíte, že 98 889 bude těch lehčích a zbytek, tedy 1 111 těžších. Když v téhle vaší atmosféře vyroste rostlina, jejíž tělo zanalyzujete, zjistíte, že obsahuje mezi 100 000 atomů uhlíku ne 1 111 ale o něco méně, přesněji 1 091 ( $\pm$  několik jednotek) atomů  $^{13}\text{C}$  a naopak přibližně o 20 atomů izotopu  $^{12}\text{C}$  více. A to vždy; ať měření opakujete, zpřesňujete a ověřujete sebevíce-krát. Logicky dojdete po takové zkušenosti k závěru, že

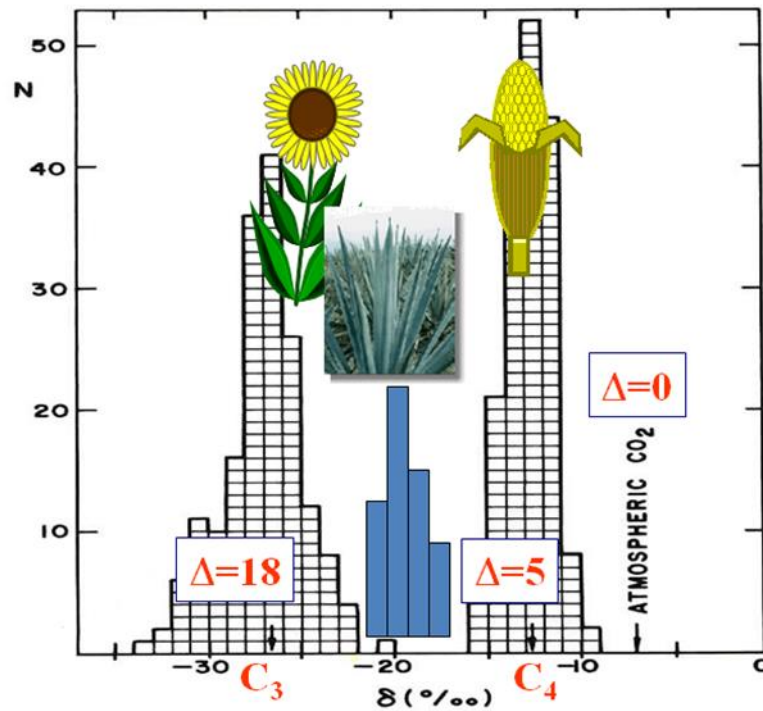
rostliny z nějakého záhadného vám neznámého důvodu „nemají rády“, diskriminují  $^{13}\text{CO}_2$  před  $^{12}\text{CO}_2$ . Tento jev, který dostal název izotopová diskriminace uhlíku při fotosyntéze, byl teprve po 40 letech od prvního pozorování vysvětlen několika skupinami autorů, z nichž největší podíl na tom měli Farquhar, O'Leary a Berry, kteří publikovali svoji práci v roce 1982.

---

*Historie objevů spojených s izotopovou diskriminací uhlíku rostlinami je popsána např. v knize autorů Ehleringer, Hall, Farquhar (1993). Zde zmíníme jen to, že prvními, kdo pozoroval a uveřejnil svá zjištění, že těžší izotop uhlíku je obsažen v menší míře v rostlinách byli fyzikové Nier a Gulbransen v roce 1939. Dalších asi dvacet let trvalo, než vědci doložili správně podstatu tohoto jevu:  $\text{CO}_2$  rozpuštěný ve vodě ještě ochuzen o  $^{13}\text{C}$  nebyl ale uhlík v uhlohydrátech (cukrech z fotosyntézy) už ano (Park a Epstein 1961). K diskriminaci tedy muselo dojít v listech během fotosyntézy. Autoři tehdy ale ještě nesprávně přisuzovali hlavní roli transportu  $\text{CO}_2$  kořeny rostlin. Trvalo dalších téměř dvacet let práce geochemiků, biochemiků a rostlinných fyziologů než bylo zřejmé, co se s izotopem  $^{13}\text{C}$  děje a musel předcházet objev existence  $\text{C}_4$  a CAM typů fixace uhlíku (Kortshak a spol. 1965 a Hatch a Slack 1966) aby bylo jasné, proč jsou některé druhy rostlin silně ochuzené o  $^{13}\text{C}$  a jiné jen minimálně a proč je toto ochuzení závislé částečně na podmínkách prostředí v kterém rostlina vyrostla. Koncem 70-tých let bylo jasné, že příčinou izotopového ochuzení rostlin je hlavně karboxylační reakce a v menší míře také difuze  $\text{CO}_2$ . Zásahu měli hlavně Graham Farquhar, Maron O'Leary a Joe Berry (1982), kteří přišli na to, že diskriminace je určována hlavně koncentrací  $\text{CO}_2$  v mezibuněčných prostorech uvnitř listu. Následující desetiletí až dodnes se tento objev rozvíjel, model diskriminace uhlíku zpřesňoval (a stále zpřesňuje, např. Cernusak et al. 2013) a objevila se řada jeho aplikací.*

---

Už víme, že izotopovou diskriminací nazýváme odchylku izotopového efektu od jedničky a značíme ji symbolem  $\Delta$  (velké delta). Víme také jak ji z čísel udaných v našem příkladě vypočítat:  $\Delta^{13}\text{C} = [(R_a/R_p) - 1] \cdot 1000 = [(1111/98889)/(1091/98909) - 1] \cdot 1000 = 18,5 \text{ ‰}$  ( $R_p$  je molární izotopový poměr,  $[^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$ , v rostlině a  $R_a$  v atmosféře). Náš výsledek,  $\Delta^{13}\text{C} = 18,5 \text{ ‰}$ , je typický pro skupinu tzv.  $\text{C}_3$  rostlin, které asimilují (fixují)  $\text{CO}_2$  z atmosféry pomocí enzymu ribulóza 1-5 bisfosfát karboxyláza oxygenáza (zkráceně Rubisko) a primárním produktem fixace je tříuhlíkatý cukr (proto  $\text{C}_3$  rostliny). Vedle toho existuje druhově méně početná skupina rostlin, s tzv.  $\text{C}_4$  typem asimilace  $\text{CO}_2$ , které využívají pro prvotní fixaci  $\text{CO}_2$  jiný karboxylační enzym, fosfoenolpyruvát karboxylázu a prvním stabilním produktem takové fixace je čtyřuhlíkatá organická kyselina (proto  $\text{C}_4$  rostliny). Sem patří např. tropické trávy, z plodin na našich polích např. kukuřice, ale také cukrová třtina nebo ananas. Obě skupiny  $\text{C}_3$  a  $\text{C}_4$  rostlin diskriminují  $^{13}\text{CO}_2$  v jiné míře, a to tak, že se hodnoty diskriminace získané pro rostliny z obou skupin nepřekrývají (viz obr. 2.1.1). Vedle obou izotopově odlišných  $\text{C}_3$  a  $\text{C}_4$  typů rostlin existuje ale ještě jedna skupina nazývaná CAM (z angl. *Crassulaceae Acid Metabolism*) a patří do ní rostliny typem metabolismu fixace  $\text{CO}_2$  blízké  $\text{C}_4$ , které ale jeho jednotlivé fáze provozují odděleně v čase – během dne nebo noci. Kromě tlustice (*Crassula*) a řady jiných tučnolistých druhů a kaktusů sem patří např. agáve. CAM rostliny jsou svojí hodnotou diskriminace mezi  $\text{C}_3$  a  $\text{C}_4$  rostlinami.



Obr. 2.1.1 Průměrné hodnoty diskriminace izotopu  $^{13}C$  a jejich statistické rozdělení pro skupiny  $C_3$ , CAM a  $C_4$  rostlin. Data pro  $C_3$  a  $C_4$  rostliny jsou převzata z přehledu 351 druhů trav (*Poaceae*) (upraveno podle Vogel *et al.* 1980). Hodnoty obsahu izotopu  $^{13}C$  jsou uvedeny v obou notacích,  $\delta$  i  $\Delta$ , pro  $C_3$ ,  $C_4$  rostliny a atmosférický uhlík v  $CO_2$ . Schematicky jsou vyobrazeni typičtí zástupci  $C_3$ , CAM a  $C_4$  rostlin.

Obrázek 2.1.1 ukazuje tři pozoruhodné skutečnosti. Jednak to, že všechny rostliny jsou ochuzené o izotop  $^{13}C$  oproti atmosféře, zadruhé, že míra diskriminace je specifická pro  $C_3$ , CAM a  $C_4$  rostliny, a zatřetí, že se míra diskriminace může lišit také mezi druhy uvnitř každé z  $C_3$ , CAM a  $C_4$  skupin a největší variabilita je mezi  $C_3$  rostlinami. Pojdme nejprve pátrat po příčinách; proč rostliny méně ochotně asimilují  $^{13}CO_2$  a poněkud preferují  $^{12}CO_2$ ; početně – proč je diskriminace  $\Delta^{13}C$  kladné číslo? Po přečtení předchozích kapitol asi tušíte, kam směřujeme: k tzv. kinetické a rovnovážné frakcionaci. Kinetická frakcionace odráží rozdíly v rychlosti reakcí pro obě izotopově odlišné látky (izotopology), zatímco frakcionace během reakcí, které probíhají oběma směry je důsledkem rozdílu rovnovážných konstant pro oba izotopology. Jak se oba typy frakcionace projevují při fotosyntetické asimilaci  $CO_2$ ?

## 2.2 Kinetická izotopová frakcionace $CO_2$ během difuze

Molekuly  $CO_2$  se dostávají z atmosféry dovnitř listů difuzí (tj. transport po spádu koncentrace) přes otvory v pokožce listu (tzv. průduchy), které rostlina zavírá nebo otvírá hlavně podle toho, zda má dostatek vody a zda svítí slunce nebo je tma. Těžší molekuly  $CO_2$  ( $^{13}CO_2$ ) ale difundují pomaleji než lehčí  $^{12}CO_2$  protože se při dané teplotě pohybují s menší střední rychlostí mezi dvěma molekulárními kolizemi. Molekulární tok  $^{13}CO_2$

bude tedy menší než tok  $^{12}\text{CO}_2$ . Toto fyzikové vyjadřují tzv. difuzním koeficientem  $D$ , který je pro těžší  $^{13}\text{CO}_2$  nižší než pro lehčí  $^{12}\text{CO}_2$ . Např. jeho hodnota pro difuzi  $^{12}\text{CO}_2$  ve vzduchu (při 20 °C) je  $D_{12\text{CO}_2}=0.1603 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$  a pro  $^{13}\text{CO}_2$ ,  $D_{13\text{CO}_2}=0.1596 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ . Poměr  $D_{12\text{CO}_2}/D_{13\text{CO}_2}$  (číselně zde 1,0044) se nazývá **izotopový efekt  $\alpha$**  a říká nám, že  $\text{CO}_2$  je po proběhlé difuzi 1,0044-krát obohaceno o  $^{12}\text{CO}_2$ , nebo 0,9956-krát ochuzeno o  $^{13}\text{CO}_2$  ve srovnání s původním stavem před difuzí. Dlouhá desetinná čísla se špatně pamatují, proto se z izotopového efektu odvodila veličina frakcionační faktor jako odchylka izotopového efektu od jedničky<sup>7</sup>  $\varepsilon = (\alpha-1)\cdot 1000$ . Faktor  $\varepsilon$  je tedy také bezrozměrná veličina vyjádřená obvykle v promile (‰, jedno promile = jedna tisícina). Takže v našem případě difuze  $\text{CO}_2$  ve vzduchu je  $\varepsilon_a = (1,0044-1)\cdot 1000 = 4,4 \text{ ‰}$  (index „a“ z anglického *air*).

*Frakcionační faktor můžete zjistit měřením difuzních koeficientů  $^{13}\text{CO}_2$  a  $^{12}\text{CO}_2$  (čistý  $^{13}\text{CO}_2$  je možné koupit, i když je velmi drahý, a experimentovat s ním) ale můžete se také přesvědčit teoretickým výpočtem, že je skutečně 4,4 ‰. Uvedeme způsob výpočtu pro případ, že byste v budoucnu potřebovali odvodit hodnoty kinetického frakcionačního faktoru pro difuzi látek, které nejsou běžné a chtěli jste se vyhnout pracnému a nákladnému měření. Výpočet založený na tzv. redukovaných molekulárních hmotnostech je publikován např. v práci Farquhar, O'Leary, Berry (1982).*

*Pro jednoduchost uvažujme tzv. binární difuzi tj. systém, kdy jedna látka difunduje v jediné jiné látce. Řekněme, látka o molekulové hmotnosti  $m_2$  difunduje v látce o hmotnosti  $m_1$ . Binární difuzní koeficient je nepřímo úměrný druhé odmocnině z tzv. redukované molekulové hmotnosti  $m_r=m_1\cdot m_2/(m_1+m_2)$ . Pro systém  $^{12}\text{CO}_2$  ( $m_2 = 44$ ) difundujícího ve vzduchu (molekulová hmotnost průměrné „molekuly vzduchu“  $m_1$  je 29) je  $m_r=m_1\cdot m_2/(m_1+m_2)=17,4795$ . Podobné platí pro redukovanou hmotnost  $^{13}\text{CO}_2$  s  $m_3=45$  místo  $m_2$ :  $m_r=17,6351$ . A protože víme, že izotopový efekt  $\alpha$  je roven poměru difuzních koeficientů obou izotopologů, platí:*

$$\alpha = \frac{D_{12\text{CO}_2}}{D_{13\text{CO}_2}} = \sqrt{\frac{m_3 \cdot (m_2 + m_1)}{m_2 \cdot (m_3 + m_1)}} \cong 1.0044$$

*I podle teoretického výpočtu tedy platí, že  $\varepsilon_a = (1,0044-1)\cdot 1000 = 4,4 \text{ ‰}$*

Závěrem, difuze  $^{13}\text{CO}_2$  je pomalejší než difuze  $^{12}\text{CO}_2$  což ve vzduchu způsobuje ochuzení „produktu“ o  $^{13}\text{CO}_2$ , které se dá vyčíslit frakcionačním faktorem 4,4 ‰. Toto číslo je možné využít v případě, že jde skutečně o molekulární difuzi v klidném nemíchaném vzduchu. Často se setkáváme s difuzí v hraniční vrstvě objektů (např. listů rostlin) obtékaných vzduchem<sup>8</sup>. Zde dochází k laminárnímu proudění a frakcionační faktor je menší. Empirická měření ukazují, že se snížení izotopového efektu dá vyjádřit exponentem 2/3. Takže frakcionační faktor při difuzi v hraniční vrstvě je  $\varepsilon_h (1,0044)^{2/3}$ .

<sup>7</sup> Pojmy frakcionační faktor a diskriminace jsou matematicky identické. Diskriminace ( $\Delta$ ) se používá pro vyjádření relativního rozdílu v izotopovém složení mezi substrátem a produktem zatímco frakcionační faktor ( $\varepsilon$ ) vyjadřuje míru frakcionace charakteristickou pro daný proces (např. difuzi, karboxylaci a pod.)

<sup>8</sup> Hraniční vrstva je tenká vrstvička vzduchu, řádově desetinny mm, která se vytváří nad povrchem těles v proudícím vzduchu. Je charakteristická ne zcela nehybným vzduchem ale také ne turbulentním promícháváním; dochází zde k tzv. laminárnímu proudění, kdy se jednotlivé sub-vrstvičky posouvají jakoby po sobě. Její síla závisí na rychlosti větru a velikosti tělesa.

1)·1000 = 2,9 ‰. Dále je užitečné si uvědomit, že kinetický frakcionační efekt je menší při difuzi v kapalině než v plynu, protože rychlost difuze v kapalině závisí více na objemu než na hmotnosti molekuly. A protože je rozdíl v hmotnostech molekul  $^{13}\text{CO}_2$  a  $^{12}\text{CO}_2$  větší než rozdíl v jejich objemech, je frakcionační faktor ve vodě difundujícího  $\text{CO}_2$  pouze,  $\varepsilon_w = 0,7 \text{ ‰}$ . V některých spíše výjimečných situacích v případě difuze  $\text{CO}_2$  do listů rostlin, kdy jsou průduchové štěrby velmi malé (menší než cca 0,1  $\mu\text{m}$  např. při suchu a malé ozáření) může docházet k jinému typu tzv. molekulární nebo Knudsenovy difuze, kdy frekvence srážek molekul se stěnami póru jsou častější než frekvence intermolekulárních srážek. Frakcionační faktor za takových podmínek je podstatně větší než  $\varepsilon_a$  při běžné difuzi (4,4 ‰) a má hodnotu 11,3 ‰. Hodnoty vodivosti průduchů, při kterých se Knudsenova difuze pravděpodobně uplatňuje, jsou pod 0,05 mol ( $\text{H}_2\text{O}$ )  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Faquhar a Lloyd 1993).

### 2.3 Kinetická izotopová frakcionace během fotosyntetické fixace $\text{CO}_2$

Molekuly oxidu uhličitého, které se dostaly do vzdušného mezibuněčného prostoru uvnitř listu, se před svojí další difuzní cestou do chloroplastu musí rozpustit ve vodou téměř nasycené buněčné stěně. Teď už víme, že je zde relativně méně  $^{13}\text{CO}_2$  molekul než bylo v atmosféře okolo listu (o 4,4 ‰). Přeskočíme pro tuto chvíli frakcionaci při rozpouštění, solubilizaci ( $\varepsilon_s = 1,1 \text{ ‰}$ ) a při difuzi  $\text{CO}_2$  uvnitř buňky (prakticky ve vodě,  $\varepsilon_w = 0,7 \text{ ‰}$ ), které jsou relativně malé. Věnujme se stavu, kdy  $\text{CO}_2$  doputovalo vodným prostředím uvnitř buněk do chloroplastu, kde se setkalo s molekulou karboxylačního enzymu zkráceně nazývaného Rubisko (ribuloza-1,5-bisfosfát karboxyláza oxygenáza). Tento enzym ve svém reakčním centru váže molekulu pětiuhlíkatého cukru ribuloza-1,5-bisfosfátu (RUBP) a zprostředkuje jeho karboxylaci tj. navázání molekuly  $\text{CO}_2$ . Nestabilní šestiuhlíkatá sloučenina se pak rozštěpí na dvě tříuhlíkaté, z nichž část (každá šestá) opouští tzv. Calvinův cyklus jako tříuhlíkatý cukr (trioza) 3-fosfoglyceraldehyd (3-PGA):



(1)

Právě karboxylace na enzymu Rubisko je z izotopového hlediska „horký bod“. Jeden neutron navíc způsobuje, že je  $^{13}\text{CO}_2$  při karboxylaci „*persona non grata*“. Z hlediska molekulární dynamiky se tento fakt vysvětluje menšími molekulovými vibracemi  $^{13}\text{CO}_2$  v porovnání s lehčím  $^{12}\text{CO}_2$ , a jejich významem při nasednutí  $\text{CO}_2$  do reakčního centra Rubisko. Zkrátka  $^{12}\text{CO}_2$  má větší pravděpodobnost karboxylace než  $^{13}\text{CO}_2$ . Výše uvedenou reakci je možné nechat proběhnout ve zkumavce. Pokud změříme izotopový poměr  $\text{CO}_2$  jako substrátu (rozpuštěného ve stromatu chloroplastu simulovaného reakční směsí ve zkumavce,  $R_{\text{CO}_2} = [^{13}\text{CO}_2]/[^{12}\text{CO}_2]$ ) a izotopový poměr uhlíku v produktu tj. 3-PGA,  $R_{\text{PGA}} = [^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$ , zjistíme, že je produkt ochuzen o  $^{13}\text{C}$  s faktorem 29 ‰. Frakcionační faktor při karboxylaci pomocí Rubisko je tedy  $\varepsilon_b = (\alpha - 1) \cdot 1000 = [(R_{\text{CO}_2}/R_{\text{PGA}}) - 1] \cdot 1000 = 29 \text{ ‰}$ <sup>9</sup>. Proti plynnému  $\text{CO}_2$  v listu je PGA ochuzen asi o 30 ‰

<sup>9</sup> Používáme zde notaci podle Farquhara, kde  $\alpha$  se nazývá „izotopový efekt“ a počítá se jako poměr izotopových poměrů reaktantu (substrátu) k produktu. Někde se lze setkat s původní notací navrženou Craig-em (1954) a používanou např. Vogel-em (Vogel 1993), kde  $\alpha$ , označované jako „frakcionační

( $\epsilon_b + \epsilon_s$ ). Tato hodnota je pozoruhodně málo závislá na teplotě i na pH při kterém se karboxylace děje. Rubisko je evolučně velmi starý enzym, jehož kinetické parametry se v evoluci měnily. Přesto Rubisko současných vyšších rostlin vykazuje poměrně stálý izotopový frakcionační faktor (variabilita do 1 ‰). Větší odchylky od běžné hodnoty  $\epsilon_b = 29$  ‰ jsou známy např. u purpurové sirmé bakterie *Rhodospirillum rubrum*, jejíž Rubisko se strukturně výrazně odlišuje od vyšších rostlin (je dimerem pouze větších podjednotek, ne hexadekamerem z 8 větších a 8 menších podjednotek jako Rubisko vyšších rostlin a řas). Například, zjištěné hodnoty izotopového složení ( $\delta^{13}\text{C}$ ) karboxylačních produktů Rubisko tabáku, *R. rubrum* a Rubisko u jejíž velké podjednotky byl leucin 335 nahrazen valinem byly -27,4 ‰, -22,2 ‰, a -11,2 ‰ (McNevin *et al.* 2007). Většina rostlin kolem nás využívá téměř výhradně popsaný způsob karboxylace pomocí Rubisko; jde o tzv.  $\text{C}_3$  rostliny. Přesto i tyto rostliny získávají asi 10 ‰ uhlíku pomocí jiného karboxylačního enzymu, nazývaného fosfoenolpyruvát karboxyláza (PEPC). Ten má frakcionační faktor velmi malý (asi 2 ‰, viz dále), a proto se obvykle při výpočtech diskriminace uhlíku v  $\text{C}_3$  rostlinách používá 27 ‰ jako průměrná vážená hodnota frakcionačního faktoru fotosyntetické karboxylace ( $\epsilon_R = 30 \text{ ‰} \cdot 0,9 + 2 \text{ ‰} \cdot 0,1 = 27,2 \text{ ‰}$ ).

V minulém odstavci jsme se dozvěděli o existenci PEP-karboxylázy. Už pionýrské izotopové analýzy herbářových položek, které prováděl ve Stockholmu Wickman počátkem padesátých let na rostlinných sběrech z transektu Sibíře (ze stanic transsibiřské magistrály) ukázaly, že rostliny ze středoasijských pouští obsahovaly relativně více  $^{13}\text{C}$  než mezofytní druhy z oblastí mírného pásma. To vedlo k domněnce, že velkou roli hraje prostředí, v kterém rostliny rostou. Dnes víme, že skutečnost byla jiná. K jejímu objasnění přispěli fyziologové a biochemici pracující (jako postdoktorandi) v geochemických laboratořích nebo tam, kde měli přístup k technice IRMS. Vysvětlení Wickmanových výsledků je v odlišném geografickém rozšíření  $\text{C}_3$  a  $\text{C}_4$  rostlin: v subtropickém klimatu se slunnými, teplými a obvykle i suchými polohami dominují rostliny s  $\text{C}_4$  typem fixace  $\text{CO}_2$  zatímco v severnějších a chladnějších oblastech naopak  $\text{C}_3$  druhy (všechny stromy mají  $\text{C}_3$  typ fotosyntézy). Adaptace rostlin, hlavně k extrémně nízké koncentraci  $\text{CO}_2$  v atmosféře Země, vedla před 10-40 milióny lety k evoluční inovaci – vzniku  $\text{CO}_2$  koncentračního mechanismu  $\text{C}_4$  rostlin. Při zpracování  $\text{CO}_2$   $\text{C}_4$  rostlinami se  $\text{CO}_2$  z atmosféry opět dostává difuzí přes průduchy do listu a rozpouští se v buněčných stěnách nasycených vodou. Významným rozdílem proti  $\text{C}_3$  druhům ale je, že jej pro karboxylaci nevyužije Rubisko až v chloroplastech ale PEP-karboxyláza (PEPC) už v cytosolu buněk. Navíc substrátem pro PEPC není rozpuštěné  $\text{CO}_2$  ale jeho hydratovaná podoba, bikarbonátový anion  $\text{HCO}_3^-$ . Jeho fixace na fosfoenol pyruvát (PEP) pomocí enzymu PEPC pak probíhá podle schématu:



kde OAA je vznikající kyselina oxaloctová resp. její anion oxalacetát (má čtyři uhlíky v molekule, proto označení  $\text{C}_4$  rostliny) a P je odštěpený fosfát. Jak už jsme uvedli, diskriminace bikarbonátu s těžkým uhlíkem ( $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ ) PEP-karboxylázou je velmi malá ( $\epsilon_P = 2$  ‰) a to je také hlavním důvodem izotopových rozdílů mezi  $\text{C}_3$  a  $\text{C}_4$  rostlinami. Celková situace je ale poněkud složitější v důsledku rovnovážné frakcionace během tvorby bikarbonátu popsané dále. A nejen to. Ti, kdo vědí, že  $\text{C}_4$  rostliny využívají při

---

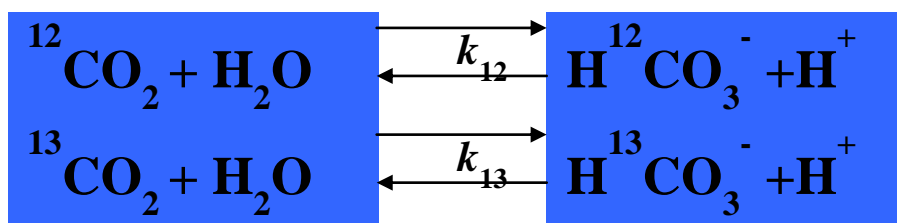
faktor“, se počítá inverzně (produkt k substrátu), a má proto záporné znaménko v případě ochuzení produktu.



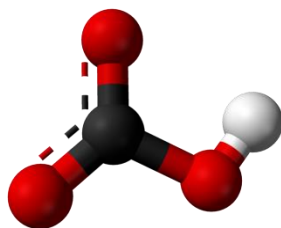
sekundární karboxylaci Rubisko, se asi budou v této fázi čtení cítit zaskočení a budou se ptát, jak je možné, že C<sub>4</sub> rostliny téměř nediskriminují <sup>13</sup>C, když mají také Rubisko? Odpověď najdete v dalších kapitolách.

## 2.4 Rovnovážná frakcionace uhlíku při fotosyntéze

Reakce, která probíhá oběma směry, se obvykle dostane po čase do rovnovážného stavu, tzn. její rychlost v obou směrech je stejná ale množství substrátu a produktu může být vychýlené na jednu nebo druhou stranu. Tento stav vychýlení charakterizuje tzv. rovnovážná konstanta. Pokud má substrát několik izotopových podob, mohou se jejich rovnovážné konstanty lišit. To je pak důvodem, izotopové frakcionace při rovnováze. Pokud se při takové reakci tvoří chemická vazba, platí obecně, že těžší izotop se hromadí na té straně rovnice, kde se vazba tvoří. Popsanou situaci nalezneme právě při hydrataci ve vodě rozpuštěných molekul CO<sub>2</sub>, tedy tvorbě bikarbonátu podle následujícího schématu,



v kterém  $k_{12}$  a  $k_{13}$  jsou rovnovážné konstanty pro CO<sub>2</sub> a HCO<sup>-</sup> s uhlíkem <sup>12</sup>C nebo <sup>13</sup>C.  $k_{13}$  je větší než  $k_{12}$ , proto se v reakční směsi hromadí <sup>13</sup>C na straně bikarbonátu (kde se tvoří nová vazba) a izotopový efekt  $\alpha = k_{12}/k_{13} = R_{\text{CO}_2}/R_{\text{HCO}_3^-} = 0,991$ . Bikarbonát je tedy v rovnovážném stavu obohacen o <sup>13</sup>C proti rozpuštěnému CO<sub>2</sub> o 9 ‰ ( $\epsilon_{\text{H}} = -9$  ‰); proti CO<sub>2</sub> v atmosféře je  $\epsilon_{\text{H}} = -5,7$  ‰. Molekula bikarbonátu (obr. 2.4.1) se tvoří spontánně po rozpuštění CO<sub>2</sub> ve vodou nasycené buněčné stěně a uvnitř buňky jeho tvorbu ještě velmi urychluje enzym anhydráza kyseliny uhličitě (*carbonic anhydrase*, CA). Díky tomu je hydratace CO<sub>2</sub> rychlá a má se za to, že v buňkách je reakce téměř vždy v rovnováze. Bikarbonátovou rovnováhu ale má smysl uvažovat při izotopových studiích jen u C<sub>4</sub> rostlin, které zpracovávají bikarbonát; Rubisko C<sub>3</sub> rostlin fixuje přímo rozpuštěný CO<sub>2</sub>, a proto se s obohacením bikarbonátu nepočítá.



Obr. 2.4.1 Model molekuly bikarbonátu s centrálním atomem uhlíku (černě) obklopeným třemi atomy kyslíku (červeně) v planárním uspořádání; na jednom z nich je asociován vodík (šedě).

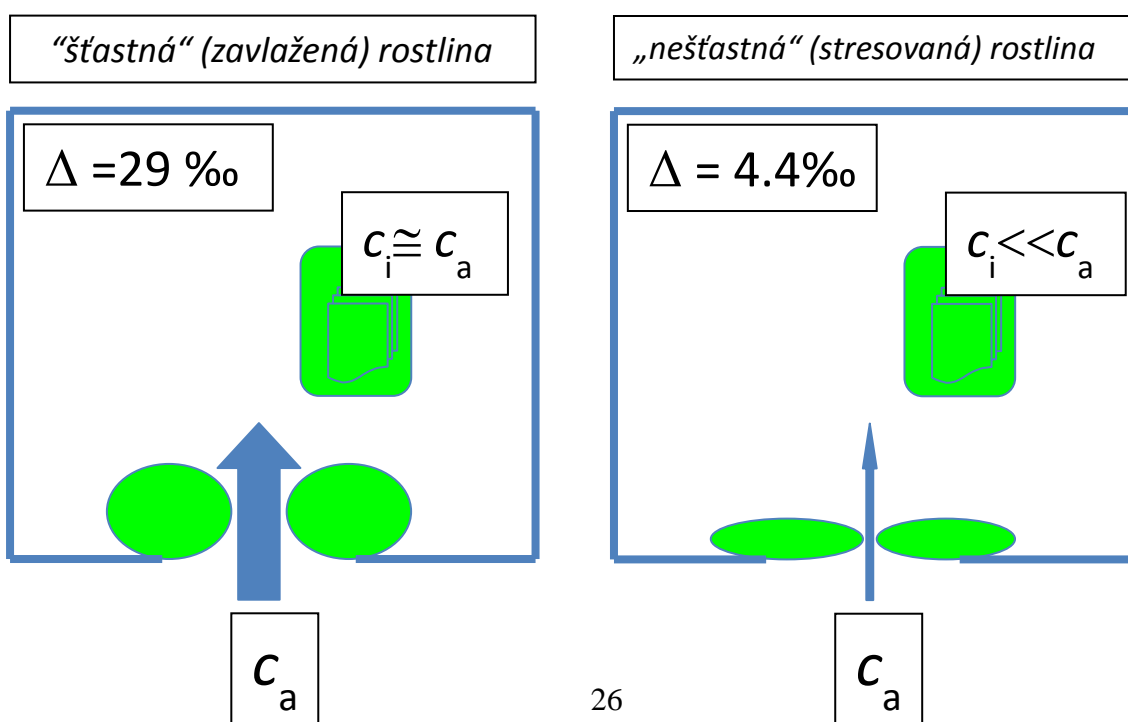
Podobně jako i ostatní rovnovážné (termodynamické) frakcionace, je i frakcionace při CO<sub>2</sub>-bikarbonátové rovnováze závislá na teplotě a udaná hodnota ( $\epsilon_{\text{H}} = -9$  ‰) se vztahuje k teplotě 25 °C.

## 2.5 Izotopová diskriminace uhlíku v živé rostlině. Kvantitativní přístup

Předchozí pojednání o frakcionaci uhlíku při fyzikálních nebo biochemických procesech je spíš kvalitativní a postrádá rozměr živé rostliny. Víme sice už, že specifické procesy v  $C_3$  a  $C_4$  rostlinách způsobují jejich izotopovou rozličnost. Víme také, že všechny zmíněné procesy se sice odehrávají v živé rostlině ale přesto hodnota  $\Delta^{13}C$ , kterou získáte analýzou rostlinného těla, bude často mimo rozsah zmíněných frakcionačních faktorů. Např. v přírodě nenajdete  $C_4$  rostlinu, která by byla obohacena o  $^{13}C$  proti atmosféře (viz obr. 2.1.1). A přesto, už víme, že bikarbonát, z kterého konec konců vznikají cukry, má záporný frakcionační koeficient ( $\epsilon_H = -5,7 \text{ ‰}$ ); je tedy obohacený proti  $CO_2$  ve vzduchu a PEPC při karboxylaci téměř nediskriminuje ( $\epsilon_P = +2 \text{ ‰}$ ). Z toho plyne, že  $C_4$  rostliny by měly být proti atmosféře obohaceny o 3-4 promile. Zdánlivý rozpor mezi teorií a praxí vzniká mimo jiné proto, že jednotlivé frakcionační faktory jsou sice aditivní, ale jejich prosté sčítání nepovede ke správné hodnotě, kterou získáme analýzou. Navíc, u  $C_4$  rostlin nám dosud asi nějaké procesy unikaly. Jak jsou tedy jednotlivé frakcionační procesy v živé rostlině integrovány? Snaha předpovědět věrně praktické výsledky IRMS analýz rostlin vedla počátkem 80-tých let k vytvoření matematického modelu (Farquhar, O'Leary a Berry, 1982), který poměrně věrně předpovídá skutečnost, dovoluje vysvětlit variabilitu v izotopovém složení mezi i uvnitř druhů a variabilitu způsobenou prostředím a nabízí aplikace ve fyziologii a biochemii rostlin. Pokusme se modelu a úvaze, která k němu vedla porozumět.

### 2.5.1 $C_3$ rostliny

Z diskuzí nad výsledky analýz rostlinného materiálu (všichni tři autoři modelu byli koncem 70-tých let na pracovišti Australské národní univerzity v Canbeře) vyplynulo, že z hlediska limitace rychlosti fotosyntézy a izotopového složení syntetizovaných cukrů mohou nastat dva limitní případy. Oba jsou znázorněny na schématech na obr. 2.5.1.1



Obr. 2.5.1.1 Schéma reakce listu rostliny na stres suchem a limitní hodnoty izotopové diskriminace uhlíku u  $C_3$  rostlin.  $CO_2$  má ve vnější atmosféře listu koncentraci  $C_a$  a difunduje do listu ve velkém množství přes plně otevřené průduchy při dostatku vody (vlevo) nebo jen v malé míře kvůli téměř zavřeným průduchům u suchem stresované rostliny (vpravo). V obou případech putuje dovnitř chloroplastů (zelený obdélník) po spádu koncentrace  $CO_2$ . Zavlažená rostlina bude mít koncentraci  $CO_2$  uvnitř chloroplastů,  $C_i$ , vysokou, v extrému blízkou vnější  $C_a$ , kdežto v chloroplastech stresované rostliny bude  $C_i$  daleko menší než  $C_a$ . Diskriminace izotopu  $^{13}C$  je pro obě rostliny výrazně jiná proto, že převládá frakcionace při karboxylaci ( $\epsilon_R=29\text{‰}$ ) nebo při difuzi  $CO_2$  přes průduchy ( $\epsilon_a=4,4\text{‰}$ ).

Ze zkušenosti víme, že rostliny stejného druhu rostoucí ve vnější atmosféře za podmínek dobré zásobenosti vodou nebo stresované suchem se liší obsahem izotopu  $^{13}C$ . První je diskriminují hodně ( $\delta^{13}C$  suché hmoty jejich těla může být např. v rozmezí  $-27$  až  $-32\text{‰}$ ) a druhé, stresované, málo ( $-23 > \delta^{13}C > -27\text{‰}$ ). Jak závislost  $\delta^{13}C$  na prostředí exaktně vyjádřit? Je dobré si předem uvědomit několik skutečností, jak to asi udělali i autoři zmíněného modelu. A/ Dílčí procesy, které v biologickém organizmu probíhají a vedou k přeměně, transportu nebo produkci látky mění její izotopové složení v závislosti na své podstatě (dané frakcionačním faktorem) ale také na tom, zda a do jaké míry jsou limitující pro tok látky nebo rychlost tvorby produktu. Zjednodušeně a v extrému, pokud karboxylace nepoběží, nebude z důvodu karboxylace docházet k diskriminaci. Pokud poběží pomalu proto, že přísun substrátu vázne (ale její kapacita substrát zpracovat je veliká), bude diskriminovat málo, protože pravděpodobnost, že se kterákoliv z molekul  $CO_2$  naváže do množství otevřených reakčních center, bude veliká. Ještě jinými slovy, míra diskriminace (realizace  $\epsilon$ ) se odvozuje od převisu nabídky (množství substrátu) nad poptávkou (kapacitou reakce); B/ Jestliže reakce zpracovává substrát v uzavřeném prostoru (reaktoru) s kontinuálním přítokem substrátu a s odvodem produktu, bude mít v izotopově ustáleném stavu produkt stejné izotopové složení jako substrát na přítoku; prostě dostane se dříve nebo později na všechny molekuly substrátu, které nemají možnost úniku, a proto nebude docházet k izotopové frakcionaci. Což ale neznamená, že by substrát v uzavřeném prostoru měl mít izotopové složení stejné s tím, který do reaktoru proudí (zdrojem). C/ izotopové „stopy“ jednotlivých procesů uspořádaných za sebou, v sérii, se sčítají.

Pro názornost se budeme dále vyjadřovat pomocí diskriminace ( $\Delta$ ), tedy relativního rozdílu  $^{13}C$  v rostlině proti její okolní atmosféře, místo  $\delta^{13}C$  (viz definice v úvodních kapitolách pro vztah mezi  $\delta^{13}C$  a  $\Delta$ ). Hodnoty  $\Delta^{13}C$  nám mohou říci, v jakém prostředí rostlina vyrostla, zda asimilaci  $CO_2$  omezovala převážně difuze v plynné fázi (bylo sucho) nebo karboxylace (přšelo). Jak tuto verbální intuitivní úvahu převést do exaktní podoby? Budeme uvažovat omezený přísun substrátu a případně omezený odběr produktu každého dílčího pochodu při asimilaci  $CO_2$ . To dosáhneme tak, že budeme „vážit“ každý dílčí frakcionační faktor rozdílem koncentrací  $CO_2$  na počátku a na konci dráhy/reakce. Ochuzení rostlinného těla o  $^{13}C$ , hodnota  $\Delta^{13}C$ , se dá vyjádřit jako<sup>10</sup>:

<sup>10</sup>V následujícím přejdeme k označování, s kterým se nejčastěji setkáváme v rostlině-izotopové odborné literatuře a kde  $a$  je frakcionační faktor při difuzi (dosud jsme používali  $\epsilon_a$ ),  $b$  je frakcionační faktor při karboxylaci pomocí Rubisco (dosud jsme používali  $\epsilon_b$  nebo  $\epsilon_R$ ) a  $e_s$  frakcionační faktor při rozpouštění (solvataci, dosud  $\epsilon_s$ ). Víme už, že  $C$  je koncentrace  $CO_2$  a velké delta ( $\Delta$ ) je diskriminace produktu (zde asimilátů) proti substrátu (zde  $CO_2$  v atmosféře kolem listu).

$$\Delta^{13}\text{C} = a_b \frac{C_a - C_s}{C_a} + a \frac{C_s - C_i}{C_a} + a \frac{C_i - C_w}{C_a} + (e_s + a_l) \frac{C_w - C_c}{C_a} + b \frac{C_c}{C_a} - \frac{eR_d/k + f\Gamma^*}{C_a}$$

### 2.5.1.1

Indexy  $a$ ,  $b$ ,  $s$ ,  $i$ ,  $w$ ,  $l$ ,  $c$  označují místo, v kterém se daná veličina sleduje:  $a$  = volná atmosféra,  $b$  = hraniční vrstva (*boundary layer*),  $s$  = povrch listu (*surface*),  $i$  = podprůduchová dutina (intercelulární prostor v listu),  $w$  = buněčná stěna (*cell wall*),  $l$  = „kapalná fáze“ uvnitř buněk, cytosol,  $c$  = vnitřek chloroplastu. Přes zdánlivou složitost jde jen o součet izotopových efektů (přesněji frakcionačních faktorů) dílčích procesů (difuze  $a$ , rozpouštění a difuze ve vodě  $e_s + a_l$ , karboxylace  $b$ ) vážených relativním rozdílem koncentrací  $\text{CO}_2$  ( $C$ ) na začátku a konci dráhy, kterou se  $\text{CO}_2$  přenáší. Přitom  $a_b$  je efekt difuze v hraniční vrstvě vzduchu nad listem s laminárním prouděním (2,9 ‰),  $a$  je efekt difuze v nemíchaném vzduchu (4,4 ‰),  $e_s$  a  $a_l$  jsou izotopové efekty při rozpouštění - solubilizaci  $\text{CO}_2$  v buněčné stěně a při difuzi rozpuštěného  $\text{CO}_2$  v cytoplasmě a stromatu (1,1 a 0,7 ‰) a  $b$  je frakcionace spojená se samotnou karboxylací enzymem Rubisco (29 ‰). Poslední výraz, který se odečítá a snižuje tak míru diskriminace jde na vrub dekarboxylacím - fotorespiraci (dekarboxylaci glycinu, jejíž frakcionační faktor  $f = 8$  ‰,  $\Gamma^*$  je kompenzační koncentrace  $\text{CO}_2$  v listu při absenci respirace) a respiraci na světle  $R_d$  - a často se předpokládá, že je malý. Proto se většinou zanedbává. Zařazení tohoto členu respektuje skutečnost, že list na světle (foto)respiruje a uvolněný  $\text{CO}_2$  z mitochondrií se opět re-asimuluje ve fotosyntéze.

Frakcionační faktory (díličí izotopové efekty) jsou fyzikálně-chemické „konstanty“ téměř nezávislé na druhu rostliny, podmínkách, při kterých roste apod. Na podmínky ale reagují průduchy, případně fotosyntetický aparát a v důsledku jejich reakce se zvyšují nebo snižují koncentrace  $\text{CO}_2$  uvnitř listu ( $C_i$ ,  $C_w$ ,  $C_c$ ). Diskriminace  $\Delta^{13}\text{C}$  pak nese „podpis“ těchto změn podmínek a koncentrací  $\text{CO}_2$  integrovaný za celý čas, po který rostlina fixovala uhlík. Výše uvedený vztah nabývá na praktickém významu, pokud situaci zjednodušíme a budeme předpokládat, že vnitřní transportní vodivost listu k  $\text{CO}_2$  je nekonečně velká, a tedy že koncentrace  $\text{CO}_2$  v intercelulárních prostorech ( $C_i$ ) je stejná s koncentrací v místě karboxylace uvnitř chloroplastů  $C_c$ . Přidáme ještě experimentálně splnitelný předpoklad, že vodivost hraniční vrstvy vzduchu nad listem je velká a  $C_a$  je proto velmi blízká koncentraci na povrchu listu  $C_s$ . Potom první, třetí a čtvrtý člen vztahu 2.5.1.1 budou blízké nule a můžeme je vynechat. Zanedbáme-li ještě příspěvek fotorespirace a respirace, dostaneme

$$\Delta^{13}\text{C} = a + (b - a) \cdot \frac{C_i}{C_a} \quad 2.5.1.2$$

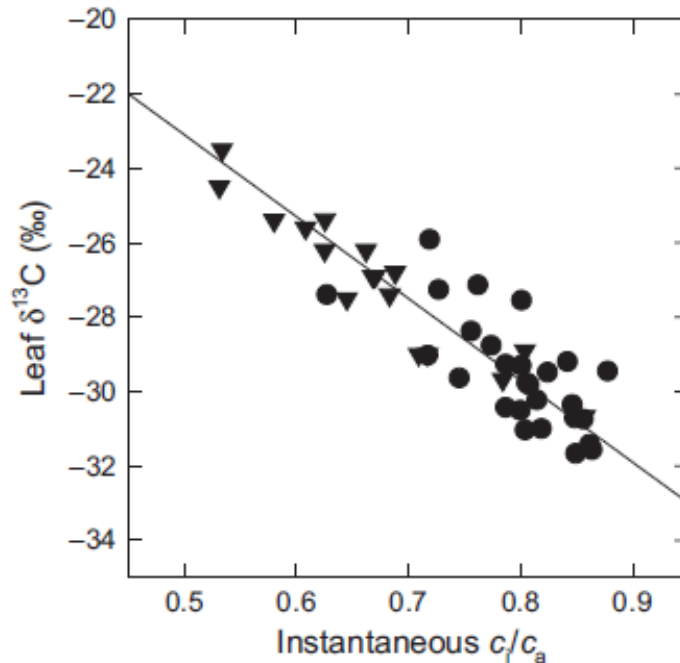
kde  $C_i/C_a$  je poměr koncentrace  $\text{CO}_2$  uvnitř listu ke koncentraci ve vnější atmosféře. S ohledem na procesy, které jsou zodpovědné za diskriminaci (difuze a karboxylace) je názornější následující podoba vztahu 2.5.1.2:

$$\Delta^{13}\text{C} = a \cdot \frac{C_a - C_i}{C_a} + b \cdot \frac{C_i}{C_a} \quad 2.5.1.3$$

v němž první člen vyjadřuje příspěvek difuze a druhý příspěvek karboxylace. Ze vztahu lze vyčíst, jak  $\Delta^{13}\text{C}$  odráží podmínky, za kterých list roste:  $C_i$  se bude blížit hodnotě  $C_a$  za situace, kdy transportní dráhy (průduchy a další struktury v listu) budou mít nekonečně velkou vodivost, nekladou difuzi  $\text{CO}_2$  žádný odpor. Pak  $\Delta^{13}\text{C}$  bude totožné s hodnotou  $b = 29 \text{‰}$ <sup>11</sup>. Takovému stavu se může přiblížit rostlina rostoucí při dostatku vody v půdě a vysoké atmosférické vlhkosti. Naopak, pokud průduchy list hermeticky izolují od okolní atmosféry, jak se může stát při chronickém stresu suchem,  $\text{CO}_2$  uvnitř listu „spotřebuje“ fotosyntéza,  $C_i$  bude velmi malé a  $\Delta^{13}\text{C}$  blízké  $a = 4,4 \text{‰}$ . Většinou se však reálné hodnoty  $C_i/C_a$  u  $\text{C}_3$  rostlin pohybují od 0,6 do 0,9, a proto diskriminace  $\Delta^{13}\text{C}$  mívá hodnoty v rozmezí 17-25. Analytické výsledky hmotnostní spektrometrie se většinou udávají vzhledem ke standardu, tedy jako  $\delta$ . Hodnoty diskriminace  $\Delta$  lze jen s malou nepřesností vyjádřit jako rozdíl obsahu  $\delta^{13}\text{C}$  v atmosféře a rostlině:  $\Delta^{13}\text{C} \cong \delta_a - \delta_p$ . Proto můžeme rovnici 2.5.1.2 také psát ve tvaru  $\delta_p = \delta_a - a - (b-a) \cdot C_i/C_a$ .

Koncentraci  $\text{CO}_2$  uvnitř listu nelze měřit přímo. Je ale běžnou praxí počítat koncentraci  $\text{CO}_2$  v intercelulárních prostorech ( $C_i$ ) na základě současného měření rychlosti transpirace a fotosyntézy (fixace  $\text{CO}_2$ ) a všechny moderní gazometrické systémy provádějí tuto operaci automaticky. Můžeme tedy dvěma nezávislými metodami změřit  $C_i$  (gazometrií) a  $\Delta^{13}\text{C}$  (pomocí IRMS). Proto bylo možné už v 80-tých letech nezávisle ověřit zda vztah 2.5.1.2 skutečně platí a jak je případně ovlivněn ne zcela splněnými předpoklady. Obr. 2.5.1.1 ukazuje jedny z mnoha výsledků takových měření na souboru krytosemenných a nahosemenných rostlin. Rovnice regresní přímky proložené měřenými daty ( $\delta_p = -12,1 - 22,0 \cdot C_i/C_a$ ) je blízká očekávanému vztahu 2.5.1.2: po vyčíslení faktorů  $a$  ( $4,4 \text{‰}$ ) a  $b$  ( $27 \text{‰}$ ) a dosazení za  $\Delta^{13}\text{C} \cong \delta_a - \delta_p$  kde  $\delta_a = -8 \text{‰}$  vychází teoretická regresní přímka  $\delta_p = -12,4 - 22,6 \cdot C_i/C_a$ .

<sup>11</sup> Kromě  $b=29 \text{‰}$  pro frakcionaci při karboxylaci prostřednictvím Rubisco se v literatuře můžete setkat s dvěma dalšími hodnotami  $b$  podle toho, zda se do ní započítává frakcionace při rozpouštění  $\text{CO}_2$  ( $b=30 \text{‰}$ ) nebo také cca desetiprocentní frakce  $\text{CO}_2$  fixovaná u  $\text{C}_3$  rostlin PEPC ( $b=27 \text{‰}$ ).



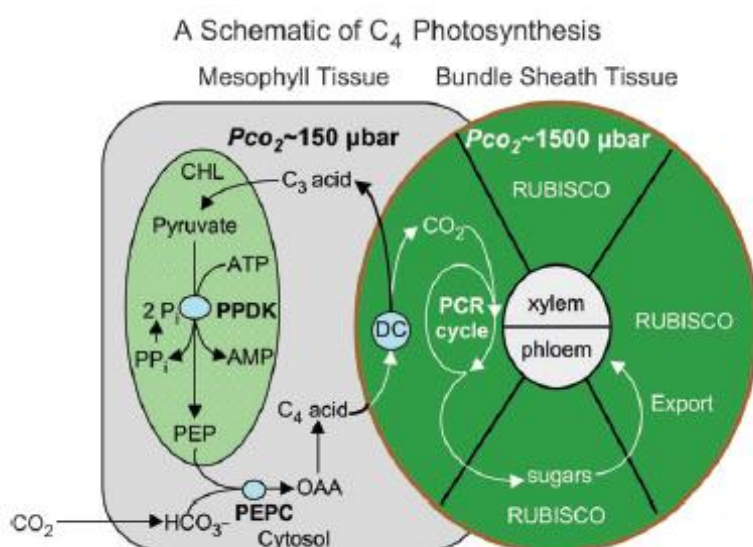
Obr. 2.5.1.1 Experimentálně zjištěný vztah mezi relativním obsahem  $^{13}\text{C}$  v listu ( $\delta^{13}\text{C}$ ) a poměrem vnitřní listové a atmosférické koncentrace  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) na souboru semenáčků krytosemenných (kolečka) a nahosemenných (trojúhelníčky) dřevin. Každý bod representuje průměr z několika jedinců téhož druhu (podle Cernusak *et al.*, 2013).

Pro porozumění pro ty, kdo nikdy neměřili výměnu plynů mezi listem a atmosférou, je potřeba zdůraznit, že hodnoty  $C_i$ , které gazometrie poskytuje, jsou tzv. „okamžité“ (*instantaneous*), tj. takové, které zjistíme v daném okamžiku měření a za daných podmínek (ozáření fotosynteticky aktivní radiací, teploty, vlhkosti atd.). Jakmile se podmínky změní např. během dne, mění se i hodnota  $C_i$  protože se mění otevření průduchů i rychlost fotosyntetické fixace  $\text{CO}_2$  uvnitř listu. V kontrastu s tím,  $\delta^{13}\text{C}$  (nebo  $\Delta^{13}\text{C}$ ) zjištěná v suché hmotě listu, je integrální veličina, jejíž hodnota se „tvorí“ po celou dobu růstu listu resp. po celou dobu kumulace biomasy (převážně celulózy). I z toho může plynout poměrně velký rozptyl bodů okolo regresní přímky v obr. 2.5.1.1. Alternativně lze měřit diskriminaci listu proti  $^{13}\text{CO}_2$  ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) použitím tzv. „on-line“ metody, kterou vyvinuli Evans *et al.* (1986). V takovém případě se měří současně okamžitá hodnota  $\Delta^{13}\text{C}$  a okamžitá hodnota  $C_i$  tak, že se napojí standardní listová komora na hmotový spektrometr a měří se změna v izotopovém složení vzduchu, který prochází kolem fotosyntetizujícího listu. V takovém experimentu pak zmíněný zdroj rozptylu bodů v obr. 2.5.1.1 odpadá. Existují však ještě dvě další možné příčiny proč teorie (data  $\Delta^{13}\text{C}$  získaná z rovnice 2.5.1.2) nemusí přesně odpovídat praxi (skutečným měřením  $\Delta^{13}\text{C}$ ). První on-line měřená diskriminace ( $\Delta^{13}\text{C}_{\text{obs}}$ ) a spočtená  $\Delta^{13}\text{C}$  pomocí rovnice 2.5.1.2 se lišily v extrému až o 8 ‰. Příčinou mohl být a) neplatný předpoklad nulového mezofylového odporu a b) heterogenní rychlost fotosyntézy na ploše listu způsobená nestejnou (mozaikovitou) průduchovou vodivostí (*stomatal patchiness*) a/nebo fotosyntetickou kapacitou (např. Šantrůček *et al.* 2003). Zatímco poslední příčinu (b) se obvykle snažíme eliminovat během měření, příčina a) se využila pro zkoumání tzv. mezofylového odporu pro přenos  $\text{CO}_2$  uvnitř listu a jeho podstaty (např. Vrábl *et al.* 2009).

Uvedený vztah mezi  $\Delta^{13}\text{C}$  a poměrem  $C_i/C_a$  lze využít pro aplikace od převážně environmentálních až po zcela biologické. V samostatných kapitolách se podrobněji zmíníme o dvou z nich. Jedna směřuje ke stanovení koncentrace  $\text{CO}_2$  uvnitř chloroplastů a ke stanovení míry limitace jakou představují vnitřní struktury listu při fixaci  $\text{CO}_2$  (tzv. mezofylová vodivost pro  $\text{CO}_2$ ); druhá k rychlému testování rostlin na účinnost využití vody (WUE) a selekci odrůd hospodářských rostlin s vyšší WUE vhodných do aridních oblastí.

### 2.5.2 $C_4$ rostliny

Jak jsme už naznačili dříve, existují rostlinné druhy, které asimilují uhlík ve dvou časově a prostorově oddělených krocích. Primárně pomocí PEP-karboxylázy, PEPC, jejímž substrátem je bikarbonátový anion ( $\text{HCO}_3^-$ , hydratované  $\text{CO}_2$  pocházející z atmosféry kolem listu) a dochází k tomu v cytosolu mezofylových buněk, a sekundárně pomocí Rubisco v buňkách pochev cévních svazků a substrátem je  $\text{CO}_2$  (dopravený do pochev v podobě  $C_4$  kyseliny – jablečnanu - a zde dekarboxylací uvolněný). Schéma těchto procesů je na obr. 2.5.2.1



Obr. 2.5.2.1 Schéma fotosyntetické fixace uhlíku  $C_4$  rostlinami (podle Sage, 2006)

Pro evoluční úspěch  $C_4$  rostlin je významné, že Rubisco pracuje v odděleném kompartmentu listu, kam se „pumpuje“ a kde se koncentruje  $\text{CO}_2$  tak, že jeho koncentrace zde dosahuje až desetinásobku té, která je v chloroplastech  $C_3$  rostlin. Proto se nemůže uplatnit „plytvavá“ oxygenázová aktivita Rubisco a  $C_4$  rostliny neztrácejí uhlík tzv. fotorespirací. Sledujme jednotlivé klíčové procesy z hlediska izotopového. Už víme, že  $\text{CO}_2$  se rozpouští v cytosolu a přitom je  $^{13}\text{CO}_2$  diskriminován ( $\epsilon_s=1,1 \text{ ‰}$ ), při hydrataci  $\text{CO}_2$  dochází k obohacení vznikajícího bikarbonátu o  $^{13}\text{C}$  s faktorem  $\epsilon_H=-9 \text{ ‰}$  a PEPC diskriminuje těžký bikarbonát ( $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ ) relativně málo ( $\epsilon_P=2 \text{ ‰}$ ). Měřením in vitro (ve zkumavce) se zjistilo, že reakci vznikající  $C_4$  kyseliny (jablečnan čili malát) je obohacen o  $^{13}\text{C}$  proti  $\text{CO}_2$  v atmosféře s faktorem  $\epsilon=-5,7 \text{ ‰}$  což je v dobré shodě se součtem všech

tří faktorů  $\varepsilon_s + \varepsilon_H + \varepsilon_P$ . Proč jsou tedy  $C_4$  rostliny ochuzené o  $^{13}\text{C}$  proti atmosféře? Hraje při tom roli diskriminace při sekundární fixaci pomocí Rubisco? Odpověď je z části asi už zřejmá: zaprvé protože  $^{13}\text{CO}_2$  je diskriminováno při difuzi do listu (2,9 ‰ v hraniční vrstvě a 4,4 ‰ při průchodu přes průduchy). Zadržuje, a to je nová informace, protože části molekul  $\text{CO}_2$ , které se hromadí v buňkách pochev cévních svazků (BSC z angl. *Bundle Sheath Cells*) se podaří uniknout z tohoto nedokonale uzavřeného kompartmentu zpět do mezofylu a případně ven z listu. To je příčina toho, proč Rubisco částečně uplatňuje svoji značně velkou diskriminaci také u  $C_4$  rostlin. Kdyby každá molekula  $\text{CO}_2$ , která vznikne z malátu v BSC neměla sebemenší možnost úniku a byla zde navždy zavřená, dříve nebo později by byla využita enzymem Rubisco, a pak by zde k diskriminaci nedocházelo; jednalo by se o uzavřený systém, kde je frakcionace nulová. Netěsnost (angl. *leakiness*) BSC a s ní spojené úniky  $\text{CO}_2$  se označuje symbolem  $\phi$ , který vyjadřuje molární podíl  $\text{CO}_2$ , které uniklo z BSC z celkového množství uhlíku fixovaného PEP-karboxylázou. Podobně jako pro  $C_3$  rostliny, bylo možné při uvědomění si předchozích skutečností sestavit matematický model izotopové diskriminace  $C_4$  rostlinami (Farquhar 1983):

$$\Delta^{13}\text{C} = a + [b_4 + \phi(b_3 - s) - a] \cdot \frac{C_i}{C_a} \quad 2.5.2.1$$

Používá se zde obdobná symbolika jako v předchozích vztazích. Tedy diskriminace při difuzi,  $a=4,4$  ‰, diskriminace při fixaci uhlíku PEPC,  $b_4=-5,7$  ‰ (dříve  $\varepsilon_P$ ), diskriminace při asimilaci uhlíku Rubisco,  $b_3=29$  ‰ (dříve  $\varepsilon_R$ ), frakcionace při úniku  $\text{CO}_2$  přes bariéru BSC,  $s=1,8$  ‰ a  $\phi$  je netěsnost BSC jako podíl uniklého z celkového fixovaného uhlíku PEPC (číslo v rozmezí 0-1). Už víme, že  $C_i/C_a$  je poměr mezibuněčné a vnější atmosférické koncentrace  $\text{CO}_2$ . Pokud v experimentu budeme pěstovat  $C_4$  rostliny a měřit u nich gazometricky  $C_i$  a spektrometricky  $\Delta^{13}\text{C}$ , bude jedinou neznámou v rovnici 2.5.2.1 parametr netěsnosti  $\phi$  a můžeme jej vypočítat. Takovým způsobem se zjistilo, že se netěsnost může pohybovat v poměrně širokém rozmezí od 0,1 do 0,7. To znamená, že 10 až 70 procent všeho fixovaného uhlíku PEP-karboxylázou se může „ztratit“ z dosahu Rubisco v důsledku netěsností BSC. Netěsnost je závislá na stáří rostlin i na podmínkách prostředí, hlavně ozáření fotosynteticky aktivní radiací, FAR (např. Kubásek *et al.* 2007). Při nižší nebo proměnlivé FAR, jaká může být např. v zápoji porostu („světelné skvrny“) úniky stoupají. To je asi jedna z příčin proč druhy rostlin s  $C_4$  typem fotosyntézy téměř nikdy nenacházíme v podrostu lesů nebo jiné vegetace (např. Kubásek *et al.* 2013).

### 2.5.3 CAM rostliny

Izotopový „obraz“ vegetace na Zemi má tři oddělené vrcholy odpovídající  $C_3$ ,  $C_4$  a CAM typům fotosyntetické fixace uhlíku (viz obr. 2.1.1). CAM rostliny představují co do globální čisté primární produkce organických látek nejméně významnou skupinu, ale míra jejich adaptace k extrémnímu nedostatku vody dosáhla vrcholu. Mnoho druhů tučnolistých rostlin, kaktusy nebo např. agáve se brání nadměrnému výparu tím, že, na rozdíl od  $C_3$  a  $C_4$  rostlin, zavírají průduchy přes den a otevírají je v noci, kdy je teplota nižší a nároky na výpar minimální.  $\text{CO}_2$  tedy difunduje z atmosféry do listu během noci a zpracovává se v principu stejně jako u  $C_4$  rostlin, tedy karboxylační reakcí katalyzovanou



PEP-karboxylázou. Rozdíl je jen v tom, že se vznikající C<sub>4</sub>-kyselina (jablečnan neboli malát) netransportují ven a neukládají v oddělených specializovaných buňkách pochev cévních svazků, ale ukládají se během noci ve vakuolách. Během dne, kdy se průduchy uzavřely, se malát odvádí z vakuol do cytosolu, dekarboxyluje se a vznikající CO<sub>2</sub> difunduje do chloroplastů, kde jej při vysoké koncentraci fixuje Rubisco. V ideálním případě plynotěsného systému (bez úniku CO<sub>2</sub>) můžeme pro diskriminaci <sup>13</sup>C CAM rostlinami můžeme použít vyjádření podobné jako je pro C<sub>3</sub> rostliny (rovnice 2.5.1.2) jen s diskriminací PEP-karboxylázou ( $b_4 = -5,7 ‰$ ) místo Rubisco:

$$\Delta^{13}C = a + (b_4 - a) \cdot \frac{C_i}{C_a} \quad 2.5.2.2$$

Při  $C_i/C_a$  typickém pro CAM rostliny, tj. od 0,4 do 0,7, vychází  $\Delta^{13}C$  blízka nule, tedy nižší než u C<sub>4</sub> rostlin. To odporuje skutečnosti. Z praktických měření diskriminace u CAM rostlin víme, že jejich  $\Delta^{13}C$  bývá v rozmezí přibližně od 3 do 15 ‰. Příčinou je to, že CAM rostliny nevyužívají pouze popsáný způsob fixace CO<sub>2</sub> ale na sklonku dne, pokud je všechn malát dekarboxylován, otevírají průduchy a zapojují do asimilace CO<sub>2</sub> také Rubisco. Výsledný izotopový signál jejich těla je pak integrálem fixace CO<sub>2</sub> pomocí PEPC (rovnice 2.5.2.1) a Rubisco (vztah 2.5.1.2) (Farquhar *et al.* 1998). Experimentálně lze tuto skutečnosti prokázat tak, že CAM rostlinám umožníte fixaci CO<sub>2</sub> pouze během dne – pak bude jejich izotopový signál  $\Delta^{13}C$  blízký C<sub>3</sub> rostlinám, nebo pouze během noci – pak bude jejich diskriminace  $\Delta^{13}C$  podobná jako u C<sub>4</sub> rostlin.

## 2.6 Shrnutí

Uhlík obsažený v zelených rostlinách je vždy ochuzený o těžší izotop <sup>13</sup>C ve srovnání s atmosférickým uhlíkem v podobě CO<sub>2</sub> jako substrátem pro fotosyntetickou asimilaci. Této vlastnosti se říká izotopová diskriminace uhlíku, lze ji měřit pomocí poměrové izotopové spektrometrie, označuje se symbolem velké delta ( $\Delta$ ) a vyjadřujeme ji bezrozměrným číslem jako relativní změnu obsahu <sup>13</sup>C mezi atmosférou a rostlinou v promile (‰). Dvěma hlavními příčinami ochuzení biomasy rostlin o <sup>13</sup>C jsou: 1) transportní procesy, hlavně difuze CO<sub>2</sub> v plynném prostředí z atmosféry přes průduchové póry do listu a 2) karboxylace katalyzovaná enzymem Rubisco. Protože jsou oba klíčové procesy citlivé k podmínkám prostředí (vlhkosti, ozáření, teplotě atd.), mění se  $\Delta$  v určitém rozmezí hodnot v závislosti na těchto podmínkách. Veličinou, která sjednocuje vliv podmínek prostředí ve vztahu k diskriminaci <sup>13</sup>C rostlinou je poměr koncentrací CO<sub>2</sub> uvnitř listu a ve volné atmosféře okolo listu ( $C_i/C_a$ ). Vztah mezi  $\Delta$  a  $C_i/C_a$  lze vyjádřit matematicky a použít v environmentálních a biologických aplikacích, např. při šlechtění rostlin na suchovzdornost. Mechanismy a hodnoty diskriminace uhlíku se liší u C<sub>3</sub> a C<sub>4</sub> rostlin. Je to hlavně proto, že C<sub>4</sub> rostliny využívají jako primární karboxylační enzym PEP-karboxylázu, která diskriminuje <sup>13</sup>C velmi málo, a potom také proto, že Rubisco, jako sekundární karboxylační enzym je uzavřen v relativně pro CO<sub>2</sub> nepropustné obálce buněk pochev cévních svazků (BSC), do níž se CO<sub>2</sub> „pumpuje“ pomocí koncentračního mechanismu. V uzavřeném prostoru BSC pak nemůže k diskriminaci docházet. Obálka BSC bývá nedokonale těsná a výsledný únik CO<sub>2</sub> se projevuje částečným uplatněním frakcionace enzymem Rubisco. Studium diskriminace u C<sub>4</sub> rostlin proto umožňuje

posudit účinnost jejich asimilace uhlíku i adaptační strategie těchto druhů. Specifickým případem z hlediska izotopového jsou CAM rostliny, které kombinují obě biochemické cesty fixace uhlíku, a proto nabývá jejich izotopové složení intermediálních hodnot mezi  $C_3$  a  $C_4$  rostlinami. Hodnoty  $\Delta$  jsou odlišné pro  $C_3$  a  $C_4$  druhy a toho lze využít pro jejich spolehlivé rozlišení. Přenos izotopového signálu  $C_3$  a  $C_4$  druhů v potravních řetězcích je pak potenciálem pro sledování dietetických návyků případně migrace živočichů včetně člověka.

## 2.8 Aplikace, případové studie

### 2.8.1 Účinnost využití vody rostlinami měřená pomocí stabilních izotopů uhlíku

#### 2.8.1.1 Co je účinnost využití vody?

Jistě vás zajímá kolik chleba nebo jiné nezbytné potraviny nebo třeba benzínu do auta pořídíte za stokorunu. Půjdete nakupovat tam, kde dostanete za své peníze víc, jinými slovy tam, kde využijete své zdroje účinněji, efektivněji. Převáděno do vztahu rostlina-člověk-prostředí, v angličtině existuje slogan „*more crop per drop*“ ve smyslu více úrody za méně vody. Voda je pro rostliny zdroj, bez kterého neporostou, nebudou asimilovat uhlík v podobě  $CO_2$  z atmosféry. Přitom je voda zdroj omezený, její množství většinou limituje růst rostlin; v některých oblastech Země kriticky a její nedostatek vede až k hladomoru. Proto bychom měli rádi k dispozici rostliny, které na jednu „kapku“ vody vytvoří co nejvíce biomasy, a tedy které využívají vodu účinně. Účinnost využití vody rostlinami (WUE z anglického *Water Use Efficiency*) je vlastnost, která je velmi odlišná mezi různými genotypy, taxony, druhy, odrůdami rostlin, a to dává naději šlechtitelům nebo genovým inženýrům při hledání druhů a odrůd s vyšší účinností. WUE je vlastnost rostlin, která kromě molekulárních fyziologů a zemědělců zajímá také ekology, hydrology nebo klimatology. Funkční skupiny rostlin a ekosystémy adaptované určitému klimatu využívají vodu s odlišnou účinností. Fotosyntéza  $A$  i transpirace  $E$  jsou procesy, které zásadně ovlivňují globální cykly uhlíku a vody na Zemi<sup>12</sup> ale i energetickou bilanci krajiny, a proto i malé globální změny WUE mohou mít velký dopad na místní nebo globální klima. Kromě toho odhalení způsobu jak rostliny upravují svoji WUE v odpovědi ke změnám klimatu pomůže předpovědět, jak se vegetace bude vyvíjet v budoucím globálně změněném klimatu, ale také dovolí rekonstruovat klima minulých geologických dob (paleoklima) např. použitím WUE analýz letokruhů fosilních zbytků dřeva (paleodendrologie).

WUE je kvantitativní vlastnost, kterou je možné vypočítat jako podíl množství  $CO_2$  asimilovaného rostlinou za určitý čas (rychlost fotosyntézy,  $A$ ) k množství vody, kterou rostlina odpaří (vytranspiruje) za stejnou dobu (rychlost transpirace,  $E$ ); tedy  $WUE=A/E$ .<sup>13</sup> Čím vyšší bude toto číslo, tím účinněji rostlina vodu využívá. Spolehlivé

<sup>12</sup> Má se za to, že asi 30-60 teratun (1 tT= $10^{15}$  kg) vody ročně vytranspiruje suchozemská vegetace výměnou za asi 110 gigatun (1 gT= $10^{12}$  kg)  $CO_2$  přijatého fotosyntézou (např. Hetherington a Woodward 2003, Jasechko *et al.*, Nature 2013)

<sup>13</sup> WUE je bezrozměrné číslo pokud  $A$  i  $E$  jsou ve stejných jednotkách, např. kg ( $CO_2$  nebo vody) za den na jednu rostlinu, nebo, jak to je obvyklé v současné vědecké literatuře v grammolekulách příslušné látky na 1 m<sup>2</sup> listové plochy za sekundu. Protože rostlina asimiluje  $CO_2$  100-1000 krát pomaleji než ztrácí vodu, a protože rádi pracujeme s čísly v řádu jednotek až desítek, nejběžněji se jako jednotka WUE užívá  $\mu mol (CO_2) mmol^{-1} (H_2O)$

stanovení WUE není snadná a laciná záležitost, zvláště na úrovni celé rostliny nebo porostu a v přirozených podmínkách. Vyžaduje zařízení, která měří toky vodní páry a oxidu uhličitého mezi rostlinou (porostem) a okolní atmosférou. Oba toky jsou značně časově proměnlivé s tím, jak se během dne mění světlo (ozáření fotosynteticky aktivní radiací), teplota, vlhkost vzduchu, a tedy je nutné toky integrovat v čase. Cílem této kapitoly je ukázat možnost jak stanovit časově integrovanou WUE pomocí analýzy rostlinného materiálu na obsah izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$ . Zmíníme základy teorie a způsob výpočtu, přednosti i úskalí této metody. Pro detaily odkážeme na novější práce rozvíjející tuto aplikaci stabilně izotopových technik.

### 2.8.1.2 Vztah mezi WUE a diskriminací $^{13}\text{C}$

Společná dráha  $\text{CO}_2$  a vody přes průduchy jako vstupní bránu do- (nebo z-) listu má za následek, že každé zvýšení produkce biomasy a plochy listů je „zapláceno“ ztrátou určitého množství vody navíc. Naopak, každý i dočasný nedostatek vody se projeví přivřením průduchů a menším množstvím fixovaného  $\text{CO}_2$  a akumulované biomasy (suché hmoty rostliny).

Rychlost ztráty vody transpirací  $E$  můžeme vyjádřit na základě Fickova zákona jako

$$E = (w_i - w_a) \cdot g_{sw} \quad 2.8.1.2.1$$

kde  $w$  označuje molární obsah vodní páry uvnitř (i) nebo vně (a) listu vztažený na mol vzduchu<sup>14</sup> [ $\text{mmol H}_2\text{O mol}^{-1}$  vzduchu] a  $(w_i - w_a)$  je tedy rozdíl v koncentraci vodní páry mezi listem a atmosférou;  $g_{sw}$  je pak difuzní vodivost průduchů pro vodní páru (v jednotkách  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Rychlost fotosyntetické fixace  $\text{CO}_2$ ,  $A$ , je dána podobně:

$$A = (C_a - C_i) \cdot \frac{g_{sw}}{1,6} \quad 2.8.1.2.2$$

kde  $C_a$  a  $C_i$  označují molární koncentrace  $\text{CO}_2$  vně a uvnitř listu (měřené v [ $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$  vzduchu]). Konstanta 1,6 je poměr binárních difuzních vodivostí pro vodu a  $\text{CO}_2$  ve vzduchu ( $g_{sw}/g_{sc}=1,6$ ). Okamžitou účinnost využití vody,  $\text{WUE}_o = A/E$ , (okamžitou angl. *instantaneous* ji nazýváme proto, že ji počítáme pro daný okamžik a podmínky prostředí, kdy měříme toky  $A$  a  $E$ ) tedy množství fixovaného  $\text{CO}_2$  za jednotku „ztracené“ vody dostaneme, když obě strany rovnice 2.8.1.2.2 vydělíme příslušnými stranami rovnice 2.8.1.2.1 a upravíme:

### 2.8.1.2.3

<sup>14</sup> Hmotnost jedné grammolekuly vzduchu se počítá jako vážený průměr všech jeho plynných složek a je 29,1 g

$$WUE_o = \frac{A}{E} = \frac{C_a \cdot \left(1 - \frac{C_i}{C_a}\right)}{1,6 \cdot (w_i - w_a)}$$

Poslední vztah ukazuje, že existují jen dva vnitřní fyziologické parametry, na kterých  $WUE_o$  závisí, a to koncentrace  $CO_2$  a vodní páry uvnitř listu  $C_i$  a  $w_i$ .  $C_i$  je snížena proti koncentraci v atmosféře  $C_a$  v míře, kterou určuje otevřenost průduchů a rychlost fixace  $CO_2$  v chloroplastech;  $w_i$  je závislá jen na teplotě listu, protože vzduch uvnitř listu se považuje za nasycený vodní parou. Už víme, že na poměru vnitřní a vnější koncentrace  $CO_2$ , tedy  $C_i/C_a$ , závisí také míra diskriminace těžkého izotopu uhlíku při fotosyntetické fixaci  $CO_2$ ,  $\Delta^{13}C$  ( $\Delta^{13}C = a + (b-a) \cdot C_i/C_a$ ), viz vztah 2.5.1.2. Toho využijeme a nahradíme poměr  $C_i/C_a$  výrazem s diskriminací  $\Delta^{13}C$ :

$$WUE_o = \frac{C_a}{1,6 \cdot (w_i - w_a)} \cdot \frac{b - \Delta^{13}C}{b - a} \quad 2.8.1.2.4$$

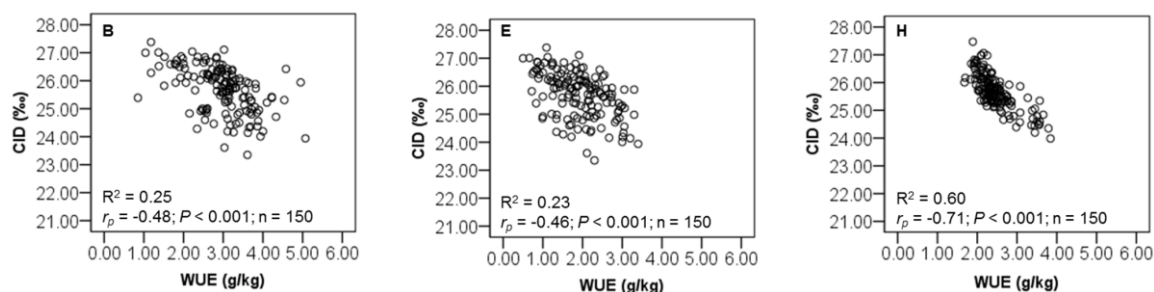
Abychom spočítali  $WUE_o$ , museli bychom kromě diskriminace izotopu  $^{13}C$  znát také teplotu listu a vlhkost vzduchu po celou dobu kdy list rostl a kumuloval biomasu diskriminovanou o izotop  $^{13}C$ . To se těžko zjišťuje, a proto zavedeme jiný, na vlhkosti vzduchu a energetické bilanci listu nezávislý typ účinnosti využití vody nazývaný vlastní (vnitřní) účinnost využití vody (angl. *intrinsic water use efficiency*),  $WUE_v$ , která vztahuje množství získaného uhlíku nikoli na množství ztracené vody ale na vodivost průduchů:  $WUE_v = A/g_{sw}$ . Příslušný vztah dostaneme, když pravou stranu rovnice 2.8.1.2.4 vynásobíme  $E/g_{sw} = (w_i - w_a)$

$$WUE_v = \frac{A}{g_{sw}} = \frac{C_a}{1,6} \cdot \frac{b - \Delta^{13}C}{b - a} \quad 2.8.1.2.5$$

$WUE_v$  je opravdu rostlině více „vlastní“, nezatížená změnami vlhkosti atmosféry, daná fyziologickými vlastnostmi listu a rostliny, především regulační funkcí průduchů a kapacitou fotosyntetického aparátu. Pokud se  $\Delta^{13}C$  stanovuje v suché hmotě rostliny nebo jejích orgánů, je vypočítaná hodnota  $WUE_v$  časovým integrálem  $WUE_v$  za celou dobu růstu po kterou probíhala kumulace uhlíku (fotosyntéza).

Z rovnice 2.8.1.2.5 vidíme, že  $WUE_v$  by měla být nepřímo úměrná diskriminaci  $^{13}C$  ( $\Delta$  je v čitateli se znaménkem minus). Jinými slovy, čím bude méně těžkého izotopu uhlíku v rostlině, a tedy bude vyšší jeho diskriminace  $\Delta$ , tím méně efektivně využívala rostlina vodu během svého růstu.  $WUE_v$  závisí implicitně na klimatických podmínkách, které ovlivňují otevírání a zavírání průduchů (i když méně než  $WUE_o$ , kde je navíc explicitní závislost na vlhkosti vzduchu – viz vztahy 2.8.1.2.3, 2.8.1.2.4), ale v řízených konstantních podmínkách je jen málo variabilní v rámci jednoho druhu. Naopak, mezidruhová variabilita  $WUE_v$  je značná. V roce 1982 až 1984 ukázali Farquhar a Richards, že mezi  $\Delta^{13}C$  a  $WUE_v$  skutečně existuje negativní korelace, jak se dá předpovědět z rovnice 2.8.1.2.5. Od té doby se vztah potvrdil na mnoha kulturních i

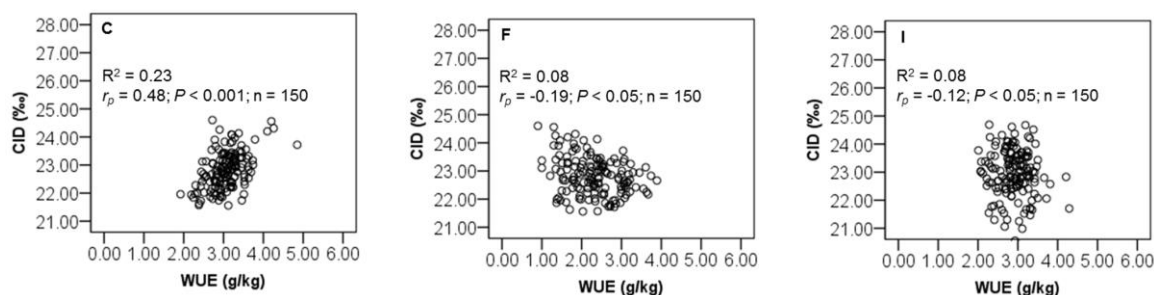
divokých druhů rostlin a  $\Delta^{13}\text{C}$  se úspěšně použilo jako kritérium ve šlechtitelských programech na suchovzdornost např. u pšenice, podzemnice olejné a bavlníku. Pravděpodobně první povolenou a komerčně využitelnou odrůdou vyšlechtěnou na základě selekce podle čistě fyziologických znaků, konkrétně  $\text{WUE}_v$  měřenou pomocí izotopové diskriminace uhlíku, byla australská pšenice nazvaná Drysdale. V podobných selekčních programech nebo komparačních studiích se obvykle srovnávají kultivary



nebo taxony pěstují v identickém prostředí (*common garden*) a odebírají se vzorky listů ve vegetační fázi vývoje. Příklady korelace mezi  $\text{WUE}$  měřené nezávisle (např. gazometricky, pomocí lysimetrů nebo eddy covariance) a  $\Delta^{13}\text{C}$  celkové biomasy listů nebo čerstvých asimilátů extrahovaných z floému je v literatuře mnoho. Na obr. 2.8.1.2.1. uvádíme výsledky získané na 150 rekombinantních imbredních liniích slunečnice pěstovaných ve dvou letech při dostatečné závlivce (sekce B, E, H) nebo vystavené stresu suchem (sekce C, F, I), (Adiredjo *et al.* 2014).

Obr. 2.8.1.2.1 Vztah mezi diskriminací izotopu  $^{13}\text{C}$  [CID ‰] a účinností využití vody [ $\text{WUE}$  g(vytvořené suché hmoty) / kg(spotřebované vody)] u 150 rekombinantních imbredních linií slunečnice pěstovaných opakovaně při dostatečné zásobenosti vodou (30 % půdní vodní kapacity), (B,E,H) nebo stresovaných suchem (16 % půdní vodní kapacity), (C,F,I). Podle Adiredjo *et al.* 2014.

I z uvedeného obrázku je vidět, že u dostatečně zavlažovaných rostlin je korelace



mezi  $\text{WUE}$  a  $\Delta^{13}\text{C}$  negativní, jak předpovídá teorie, a obvykle statisticky významná; u rostlin vystavených stresu suchem ale vazba mezi oběma veličinami bývá slabá nebo žádná. Příčinou mohou být zvyšující se respirační ztráty relativně k jednotce asimilovaného uhlíku nebo je diskriminace  $\Delta^{13}\text{C}$  nějakým zatím nepoznaným mechanismem u suchem stresovaných rostlin ovlivněna. Na přirozených stanovištích s velkou hustotou porostu nebo v polních porostech je třeba mít na paměti, že přenos tepla a vody přes hraniční vrstvu vzduchu může být významnější bariérou než samotné průduchy a to může také částečně znehodnotit korelaci mezi  $\text{WUE}$  a  $\Delta^{13}\text{C}$ . Při detailnějším studiu je potřeba mít na mysli, že vztahy 2.8.1.2.4 a 2.8.1.2.5 jsou založeny na zjednodušeném lineárním „Farquharově modelu“, jehož předpoklady, probírané

v kapitole o diskriminaci uhlíku, nemusí být vždy splněny. Nelineární model, který uvažuje diskriminaci  $^{13}\text{C}$  během fotorespirace i nenulovou hodnotu mezofylového odporu k transportu  $\text{CO}_2$  (Seibt *et al.* 2008) nabízí vysvětlení těchto odchylek od lineární nepřímé úměry mezi WUE a  $\Delta^{13}\text{C}$  a můžeme ho doporučit pro pokročilejší studie.

Mnohokrát se pozorovalo, že specifická listová plocha (SLA,  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ , která je v negativním vztahu k tloušťce listu) negativně koreluje s WUE a pozitivně s  $\Delta^{13}\text{C}$ . Zjednodušeně, čím tlustší list (např. slunný list ve srovnání se stinným listem), tím větší mívá WUE a nižší  $\Delta^{13}\text{C}$ . I tato závislost se ale dá vysvětlit na základě vztahů 2.8.1.2.3 a 2.8.1.2.5 obvykle nižším poměrem  $C_i/C_a$  u slunných listů.

### 2.8.2 Bariéry pro transport $\text{CO}_2$ do chloroplastů; Měření mezofylové vodivosti pomocí diskriminace uhlíku $^{13}\text{C}$

Ribuloza-1,5-bisfosfát karboxyláza, oxygenáza (Rubisko) se někdy nazývá „globální enzym“ proto, že obstarává téměř všechnu autotrofní fixaci atmosférického oxidu uhličitého na planetě Zemi, a tím i naši obživu. Při pohledu do chloroplastů, kde se tato reakce (karboxylace) děje bychom ale zjistili, že Rubisko pracuje na méně než čtvrtinu až polovinu své maximální kapacity. Příčin může být několik, ale mezi ty chronické patří stálý nedostatek  $\text{CO}_2$  jako substrátu pro karboxylaci. Proč je koncentrace  $\text{CO}_2$  v chloroplastech pro Rubisko nízká? A jaká ta koncentrace vlastně je? Nedala by se nějak zvýšit? Určitě by pak fotosyntéza běžela rychleji a možná by to pomohlo vyřešit hrozbu hladu ve světě s neustále rostoucí populací člověka. Podobné úvahy jsou staré už alespoň 50 let. Pro vědce, kteří modelovali průběh fotosyntézy a měřili výměnu plynů mezi rostlinou a atmosférou od konce 50-tých let minulého století bylo „svatým grálem“ poznání skutečné koncentrace  $\text{CO}_2$  ve stromatu chloroplastů  $C_c$ , tedy v místě karboxylace. Spolehlivé cesty jak ji změřit nebo spočítat ale tehdy neexistovaly. Až s rozvojem metod měření fluorescence chlorofylu a stabilně-izotopových metod se takové možnosti objevily. Tato kapitola ukáže jak je možné z měření diskriminace  $^{13}\text{C}$  rostlinou zjistit koncentraci  $\text{CO}_2$  v chloroplastech a vypočítat tzv. mezofylovou, nebo také alternativně nazývanou vnitřní listovou, vodivost pro difuzi  $\text{CO}_2$ ,  $g_m$ , jaké jsou její obvyklé hodnoty a jejich variabilita mezi různými skupinami rostlin.

Klíčový pro měření mezofylové vodivosti byl rok 1986 a zveřejnění práce Evans *et al.* (1986) v *Australian Journal of Plant Physiology*. V článku je prvně popsáno jak měřit současně (*on-line*) výměnu plynů a izotopovou diskriminaci. Nalezení způsobu, jak vypočítat aktuálně probíhající diskriminaci  $^{13}\text{C}$  fotosyntetizujícím listem ( $\Delta_{\text{obs}}$ ) uzavřeným v listové komoře, bylo v dané situaci to nejdůležitější. Šlo o diskriminaci pozorovanou (proto s indexem *obs* z angl. *observation*) u listu, kolem kterého proudil vzduch a list, tím, že při fotosyntéze diskriminoval  $^{13}\text{CO}_2$ , měnil izotopové složení tohoto vzduchu, obohacoval jej o  $^{13}\text{CO}_2$ . Evans a spol. přišli na to, jak z izotopového obohacení vzduchu uvnitř listové komory  $\Delta_a$  [ $\Delta_a = R_e/R_o - 1$  kde  $R$  je izotopový poměr ve vzduchu vstupujícím do ( $R_e$ ) a vystupujícím z ( $R_o$ ) komory] a z rozdílu koncentrací  $\text{CO}_2$  na vstupu ( $C_e$ ) a výstupu ( $C_o$ ) z komory spočítat hodnotu diskriminace při fotosyntéze,  $\Delta_{\text{obs}}$ :

$$\Delta_{\text{obs}} = -\frac{\xi \cdot \Delta_a}{1 + \xi \cdot \Delta_a} \quad 2.8.2.1$$

kde  $1/\xi$  je relativní změna koncentrace  $\text{CO}_2$  způsobená fotosyntetickou asimilací listu:  $\xi = C_e/(C_e - C_o)$ .  $\Delta_{\text{obs}}$  je diskriminace, kterou vykazují čerstvé asimiláty (jednoduché cukry)

oproti vzduchu obklopujícímu list v daný okamžik měření (odběru vzorků vzduchu do IRMS). Z kapitoly 2.5.1 a rovnic 2.5.1.2 nebo 2.5.1.3 víme, že se dá stejná veličina diskriminace spočítat, pokud známe koncentrace CO<sub>2</sub> uvnitř listu (C<sub>i</sub>, přesněji v podprůduchové dutině) a v okolní atmosféře (C<sub>a</sub>). Obě tyto koncentrace se rutinně počítají (C<sub>i</sub>) nebo přímo měří (C<sub>a</sub>) při gazometrickém zjištění rychlosti transpirace a fotosyntézy. Víme ale také, že vztah 2.5.1.2 nebo 2.5.1.3 vznikl za předpokladů zjednodušujících difuzi CO<sub>2</sub> uvnitř listu; především, předpokládali jsme, že C<sub>i</sub> = C<sub>c</sub>, tedy, že koncentrace v podprůduchové dutině je stejná s tou v chloroplastech. To nemusí být pravdivý předpoklad. Nabízí se tedy porovnat reálně změřenou veličinu Δ<sub>obs</sub> pomocí IRMS s tou, kterou vypočítáme z nezávislých gazometrických měření, tedy Δ<sup>13</sup>C, jak jsme ji nazvali ve vztahu 2.5.1.2 a zde ji pro jednoduchost označíme pouze Δ. Jejich případný rozdíl (Δ<sub>obs</sub> - Δ) by měl být vysvětlitelný nesplněním zmíněného předpokladu, tedy rozdílem mezi koncentracemi C<sub>i</sub> a C<sub>c</sub>, a měl by být úměrný tomuto rozdílu. Tedy, čím vyšší (Δ<sub>obs</sub> - Δ), tím větší rozdíl C<sub>i</sub> - C<sub>c</sub>. Jak z této úvahy vyjádřit hodnotu koncentrace CO<sub>2</sub> v chloroplastech, C<sub>c</sub>, a případně slíbenou mezofylovou difuzní vodivost?

V kapitole 2.5.1 jsme odvodili dva vztahy pro výpočet diskriminace Δ: jeden nezatížený předpoklady ale méně vhodný pro praktická měření, protože obsahoval nezměřitelné veličiny, a také složitější (viz. 2.5.1.1); druhý zavedením předpokladů, tedy možná zjednodušený a méně pravdivý, ale zato komfortní svojí jednoduchostí a možností vyčíslení na základě měřitelných veličin (viz 2.5.1.2). Rozdíly mezi nimi jsou tedy totožné s rozdílem mezi reálnou, pozorovanou diskriminací a vypočtenou z 2.5.1.2, tedy s výše uvedeným (Δ<sub>obs</sub> - Δ). Pokud zachováme předpoklady zanedbatelné diskriminace během fotorespirace a respirace a zanedbatelné diskriminace v hraniční vrstvě listu (míchání vzduchu kolem listu), ale budeme stále předpokládat zanedbatelný difuzní odpor uvnitř listu a tedy rozdíl mezi C<sub>i</sub> a C<sub>c</sub>, můžeme napsat:

$$\begin{aligned} \Delta_{obs} - \Delta &= 2.5.1.1 - 2.5.1.2. = \\ &= \left[ a \frac{C_a - C_i}{C_a} + (e_s + a_l) \frac{C_i - C_c}{C_a} + b \frac{C_c}{C_a} \right] - \left[ a \cdot \frac{C_a - C_i}{C_a} + b \cdot \frac{C_i}{C_a} \right] \end{aligned} \quad 2.8.2.2$$

Po úpravě nalezneme, že

$$\Delta_{obs} - \Delta = (b - e_s - a_l) \cdot \frac{(C_i - C_c)}{C_a} \quad 2.8.2.3$$

a koncentraci CO<sub>2</sub> v chloroplastech pak můžeme vyjádřit jako:

$$C_c = C_i - \frac{(\Delta_{obs} - \Delta) \cdot C_a}{b - e_s - a_l} \quad 2.8.2.4$$

Protože rychlost fotosyntetické fixace CO<sub>2</sub> (A) se dá vyjádřit jednoduše na základě prvního Fickova difuzního zákona jako součin rozdílu koncentrace a difuzní vodivosti, tedy A = (C<sub>i</sub> - C<sub>c</sub>) · g<sub>m</sub>, kde g<sub>m</sub> je vodivost mezofylových struktur napříč listem pro difuzi CO<sub>2</sub>, lze vztah 2.8.2.4 také upravit pro výpočet vodivosti g<sub>m</sub>:

$$g_m = \frac{(b - e_s - a_l)}{(\Delta_{obs} - \Delta)} \cdot \frac{A}{C_a} \quad 2.8.2.5$$

## 2.7 Seznam použité literatury

- ADIREDO A.L., NAVAUD O., MUÑOS S., LANGLADE N.B., LAMAZE T., GRIEU P. (2014) Genetic control of water use efficiency and leaf carbon isotope discrimination in sunflower (*Helianthus annuus* L.) subjected to two drought scenarios. *PlosOne* **9**, e101218. doi:10.1371/journal.pone.0101218.
- CERNUSAK L.A., UBIERNA N., WINTER K., HOLTUM J.A.M., MARSHALL J.D., FARQUHAR G.D. (2013) Tansley review: Environmental and physiological determinants of carbon isotope discrimination in terrestrial plants. *New Phytologist* **200**, 950–965.
- FARQUHAR G. D., EHLERINGER J. R., HUBICK K. T. (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 503-537.
- FARQUHAR G. D., LLOYD J. (1993) Carbon and oxygen isotope effects in the exchange of carbon dioxide between terrestrial plants and the atmosphere. In: Ehleringer J. R., Hall A. E., Farquhar G. D. (eds) *Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations*. Academic Press, San Diego, Boston, New York. Pp. 47-70.
- FARQUHAR G.D., O'LEARY M.H., BERRY J.A. (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **9**, 121-137.
- MCNEVIN D. B., BADGER M. R., WHITNEY S. M., VON CAEMMERER S., TCHERKEZ G.G., FARQUHAR G. D (2007) Differences in carbon isotope discrimination of three variants of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase reflect differences in their catalytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* **282**, 36068-76.
- EVANS J.R., SHARKEY T.D., BERRY J.A., FARQUHAR G.D. (1986) Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas Exchange to investigate CO<sub>2</sub> diffusion in leaves of higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**, 281-292.
- KUBÁSEK J., ŠETLÍK J., DWYER S., ŠANTRŮČEK J. (2007) Light and growth temperature alter carbon isotope discrimination and estimated bundle sheath leakiness in C<sub>4</sub> grasses and dicots. *Photosynthesis Research* **91**, 47-58.
- KUBÁSEK J., URBAN O., ŠANTRŮČEK J. (2013) C<sub>4</sub> plants use fluctuating light less efficiently than do C<sub>3</sub> plants: a study of growth, photosynthesis and carbon isotope discrimination. *Physiologia Plantarum* **149**, 528-539.
- SAGE R.F., MCKOWN A.D. (2006) Is C<sub>4</sub> photosynthesis less phenotypically plastic than C<sub>3</sub> photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* **57**, 303-317.
- SEIBT U., RAJABI A., GRIFFITHS H., BERRY J.A. (2008) Carbon isotopes and water use efficiency: sense and sensitivity. *Oecologia* **155**, 441-454.
- ŠANTRŮČEK J., HRONKOVÁ M., KVĚTOŇ J., SAGE R.F. (2003) Photosynthesis inhibition during gas exchange oscillations in ABA-treated *Helianthus annuus*: relative role of stomatal patchiness and leaf carboxylation capacity. *Photosynthetica* **41**, 241-252.
- VRÁBL D., VAŠKOVÁ M., HRONKOVÁ M., FLEXAS J., ŠANTRŮČEK J. (2009) Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> transport estimated by two independent methods: effect of variable CO<sub>2</sub> concentration and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2315-2323.



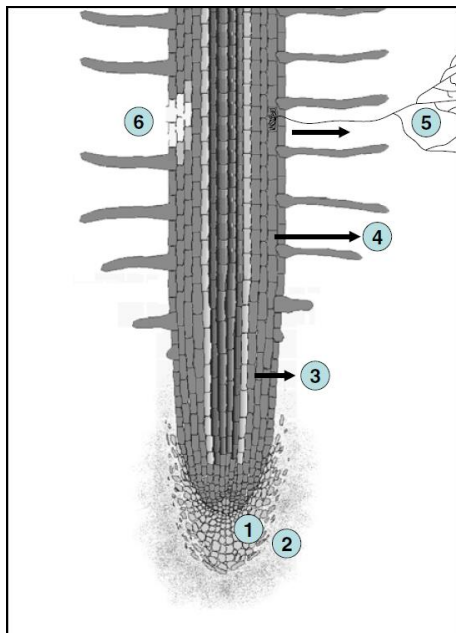
### 3 SLEDOVÁNÍ TOKU C V SYSTÉMU ROSTLINA-PŮDA POMOCÍ CO<sub>2</sub> ZNAČENÉHO IZOTOPEM <sup>13</sup>C

Eva Kaštovská

#### 3.1 Vztah rostlina-mikroorganismy-půda

Rostliny významně ovlivňují množství a kvalitu půdní organické hmoty a také složení a aktivitu půdního mikrobiálního společenstva. Děje se tak jednak prostřednictvím **rostlinného opadu** z nadzemních i podzemních částí rostlin, který na konci vegetačního období vstupuje do půdy (na povrch půdy nebo do půdního profilu), je kolonizován a rozkládán mikroorganismy. Opad je tvořen především komplexními strukturními látkami, je tedy postupně rozkládán hlavně pomocí extracelulárních enzymů. Jeho kvalita významně ovlivňuje složení společenstva dekompozitorů a také rychlost rozkladu.

Další významný prvek ve vztahu rostlina-mikroorganismy představuje **rhizodepozice** – tedy uvolňování látek z kořenů (Jones a kol. 2009). Rhizodepozicí do půdy vstupují: 1) buňky kořenové čepičky, 2) polymerní látky slizového charakteru chránící kořenovou špičku, 3) kořenové exsudáty, 4) těkavé organické látky, 5) uhlík uvolňovaný do půdy přes kořenové symbionty, např. mykorhizní houby a 6) buněčný materiál uvolněný po odumření kořenového vlášení či buněk kortexu (Obr. 3.1.1). Tyto organické látky vstupují do půdy v podstatě neustále v průběhu celé vegetační sezóny, kdy rostlina aktivně fotosyntetizuje a roste.



Obr.,3.1.1 Místa rhizodepozice z rostoucího kořene. Uvolňování 1) buněk kořenové čepičky a 2) mucigelu, který ji chrání, 3) rozpustných kořenových exsudátů, 4) těkavých organických látek, 5) C z kořenových symbiontů a 6) cytoplazmatického materiálu z odumřelých kořenových buněk (podle Jones *et al.* 2009).

Uvolňované látky mají v půdě mnoho funkcí, od látek s alelopatickými nebo antimikrobiálními účinky, přes signální molekuly, hormony, enzymy a látky ovlivňující pH půdy a zpřístupňující tak například minerální fosfor, po jednoduché látky, které jsou snadným zdrojem uhlíku a energie pro rhizosférní mikroorganismy. Prostřednictvím zvýšené aktivity rhizomikroflóry, která stimuluje také dekompozice půdní organické hmoty, tzv. rhizosférní priming efekt (viz kapitola 5), si rostlina zajišťuje dusík potřebný pro její fungování a růst. Rhizodepozice je druhově specifická, mění se podle stáří a vývojové fáze rostliny. Významně ovlivňuje složení půdního mikrobiálního společenstva (Hartmann *et al.* 2008) i jeho aktivitu. Zároveň přispívá ke stabilizaci půdních agregátů (Rasse *et al.* 2005).

### 3.2 Alokace (distribuce) uhlíku rostlinou

**Distribuce uhlíku mezi nadzemní a podzemní část biomasy významně ovlivňuje tok uhlíku do půdy, jeho přeměny, stabilizaci a ztráty ze systému.** Je dobré si uvědomit, že **základní zdroje limitující růst suchozemských rostlin jsou od sebe fyzikálně odděleny.** Nad zemí získává rostlina uhlík prostřednictvím fotosyntetické fixace CO<sub>2</sub> a k ní potřebuje světlo, které je motorem fotosyntézy, zatímco ostatní minerální živiny získává prostřednictvím kořenů z půdy. Distribuce biomasy a zdrojů mezi nadzemní a podzemní rostlinnou biomasou proto významně ovlivňuje růst, vývoj a rozmnožování rostliny. Je známo, že rostliny typické pro živinami chudé biotopy alokují více uhlíku pod zem a tvoří velké kořenové systémy, zatímco rostliny živinami bohatých půd investují hlavně do růstu nadzemní biomasy (Chapin 1980). Každá rostlina je také schopná do jisté míry měnit distribuci uhlíku mezi nadzemní a podzemní orgány a přizpůsobit se tak změnám prostředí. Například je dobře zdokumentováno, že hnojení minerálními hnojivy vede kromě podpory rostlinné produkce také ke změně distribuce biomasy ve prospěch nadzemních částí rostliny. Přídavek živin totiž snižuje konkurenci o živiny pod zemí, ale zvyšuje se konkurence o světlo nad zemí.

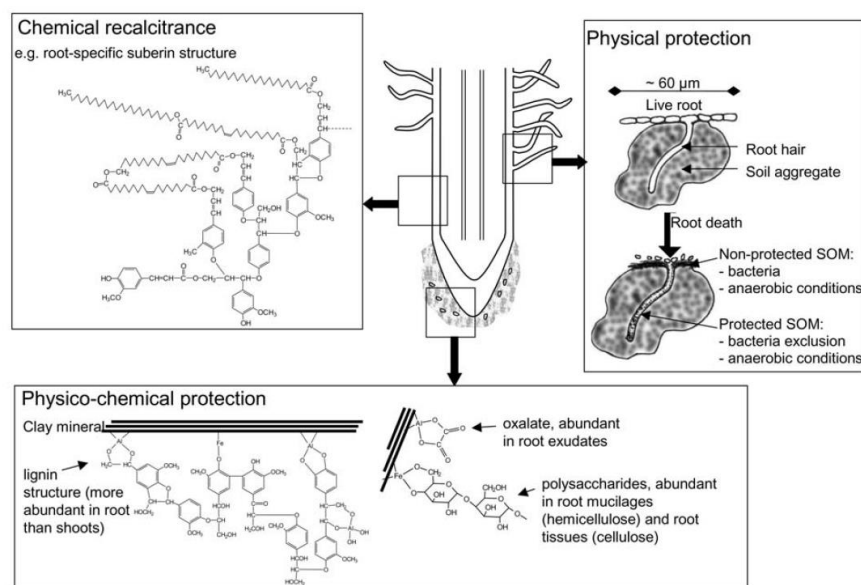
Zatímco velikost nadzemní a podzemní biomasy lze poměrně snadno stanovit, stejně tak jako čistou rostlinnou produkci (přírůstek nadzemní a podzemní biomasy ve vegetační sezóně), rostlina spotřebuje poměrně velké množství uhlíku (organických látek) k zajištění svého fungování. Tyto „ztráty“ dosahují 30-50% fixovaného uhlíku a lze je měřit s využitím značení stabilními izotopy. Kromě investice do **produkce rostlinné biomasy**, tedy do vytváření nadzemních a podzemních rostlinných orgánů, rostlina potřebuje získat energii k udržení a obnově této biomasy a velkou část fotosyntetických produktů proto **prodýchá**. Další část organických látek ztrácí v podobě již zmíněné **rhizodepozice**. Hrubý odhad ztrát uhlíku rhizodepozicí je 5-21% fotosynteticky fixovaného uhlíku (Jones *et al.* 2009).

### 3.3 Tok uhlíku pod zem

S rozvojem metod využívajících značení rostlin se stále více pozornosti soustřeďuje na uhlík, který rostlina alokuje pod zem. Tento tok je významný jak z hlediska hospodaření rostliny s uhlíkem, tak kvůli jeho významu pro tvorbu a stabilizaci půdní organické hmoty. Podle druhu rostliny a v závislosti na podmínkách prostředí **rostlina alokuje pod zem 30-70% fixovaného uhlíku** v podobě organických látek (Kuzyakov a Domanski 2000). V travinných ekosystémech může tento tok dosahovat 1,5-3 t C ha<sup>-1</sup> za jednu vegetační sezónu. Po transportu do podzemních orgánů je tento uhlík dále distribuován a

slouží k různým účelům: asi 50% ho zůstane v kořenech (růst a zásobní látky), kolem 33% je prodýcháno kořeny, kořenovými symbionty a rhizosféryními mikroorganismy (často označováno jako autotrofní respirace) a asi 12% je vázáno v půdě. Tato distribuce uhlíku je opět druhově specifická a závislá na podmínkách prostředí, ale obecně lze říci, že více jak 60% uhlíku, který rostlina transportuje pod zem je potenciálně zdrojem pro tvorbu půdní organické hmoty.

Uhlík alokovaný rostlinou pod zem a vstupující do půdy ve formě **podzemního opadu a rhizodepozice** má podle dnešních poznatků větší význam pro tvorbu a stabilizaci půdní organické hmoty než nadzemní opad. Je to dáno především jeho pomalejším rozkladem ve srovnání s nadzemním opadem a tedy delší dobou setrvání v půdě (v průměru 2-3x delší). Důvodem je jednak nižší kvalita podzemní rostlinné biomasy v porovnání s nadzemními orgány, daná vyšším podílem strukturních látek a nižší koncentrací živin, především dusíku a fosforu. Dále k tomu velmi významně přispívá stabilizace látek v půdních agregátech, mikropórech a na jílových minerálech (Obr. 3.3.1). Tato stabilizace je umožněna tím, že organická hmota z kořenů vstupuje přímo do půdního profilu a navíc je jejich stabilizace aktivně podpořena činností mikroorganismů a některými složkami rhizodepozice – především polysacharidy (Rasse *et al.* 2005). Tato možnost stabilizace u nadzemního opadu, rozkládajícím se na povrchu půdy, naprosto chybí.

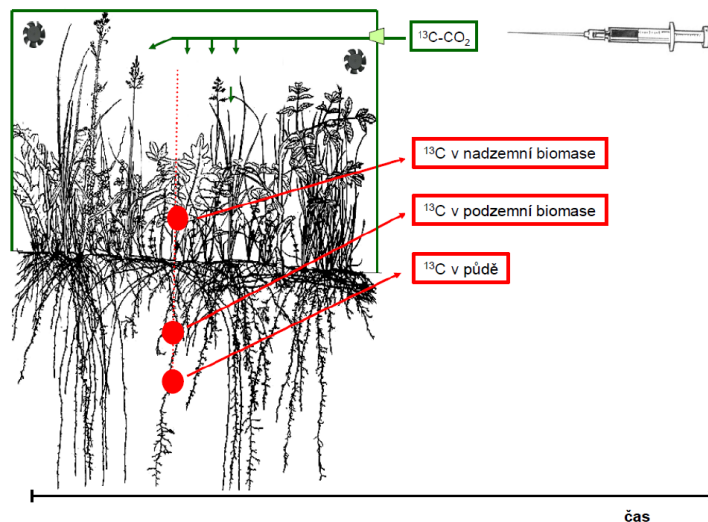


Obr. 3.3.1 Hlavní mechanismy stabilizace organické hmoty vstupující do půdy z podzemní rostlinné biomasy (podle Rasse *et al.* 2005).

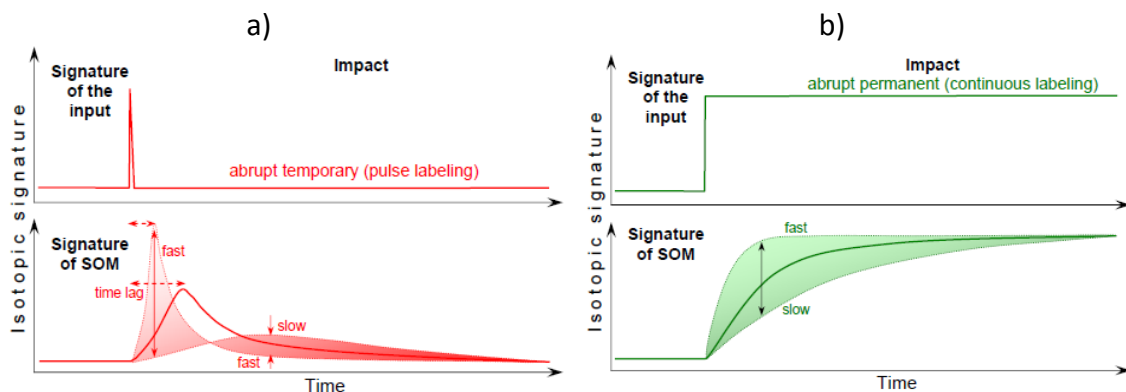
### 3.4 Značení rostlin pomocí stabilních izotopů C

Značení rostlin pomocí stabilních izotopů C umožňuje sledovat, jak rostlina s fixovaným (=značeným) uhlíkem nakládá. Princip je jednoduchý. Studované rostlině místo atmosférického CO<sub>2</sub> ( $\delta^{13}\text{C} \cong -8,5 \text{ ‰}$ , nebo 1,10 at%) nabídneme CO<sub>2</sub> s výrazně jiným zastoupením izotopů <sup>12</sup>C a <sup>13</sup>C (CO<sub>2</sub> obohacený o <sup>13</sup>C, zde označíme <sup>13</sup>C-CO<sub>2</sub>). Značení rostliny uhlíkem <sup>13</sup>C probíhá v průhledné komoře (nejčastěji plexisklo), která umožňuje rostlině fotosyntetizovat. Rostlina obohacený CO<sub>2</sub> fixuje a vytváří z něj

jednoduché organické látky, které podle svých potřeb distribuují a metabolizují. Osud takto fixovaného C lze pak sledovat ve vzorcích rostlinné biomasy a půdy (případně roztoku, ve kterém může být rostlina pěstována), odebíraných po označení rostliny (Obr. 3.4.1). Tuto techniku lze používat v laboratorních i terénních podmínkách. Vždy je přitom nutné zvážit výhody a nevýhody daného přístupu (např. umělé, ale dobře kontrolované podmínky při laboratorním značení versus přirozené podmínky, ale velká variabilita při značení v terénu), stanovit frekvenci odběru vzorků a počet opakování a brát v úvahu nutnost rychlého zpracování vzorků kvůli rychlému metabolismu sledovaných jednoduchých látek.



Obr. 3.4.1 Princip značení rostlin v uzavřené komoře pomocí  $^{13}\text{C-CO}_2$  a sledování jeho distribuce v systému rostlina-půda v čase.



Obr. 3.4.2 Rozdíl v délce trvání a) pulzního a b) kontinuálního značení a v odezvách, které lze po jejich aplikaci sledovat v izotopovém signálu půdní organické hmoty (SOM). Silná čára ve spodních částech grafů ukazuje odezvu celkové SOM a tenčí křivky pak odezvy jejich frakcí s rychlejším a pomalejším obratem (podle Kuzyakov 2011).

Existují dva způsoby značení rostlin, **pulzní a kontinuální značení**. Častěji používaným způsobem je **pulzní značení**, které je méně nákladné na vybavení i čas. Rostlina je značena po krátkou dobu, většinou pouze několik hodin (proto pulz).

Výsledkem je nehomogenní označení rostlinné biomasy, kdy jsou označeny pouze jednoduché látky, vzniklé metabolickým využitím C asimilovaného během krátké doby značení. Pulzní značení lze proto s výhodou využít právě pro sledování distribuce čerstvých asimilátů v rostlině, včetně kořenové exsudace. Lze také sledovat obrat těchto jednoduchých sloučenin v rostlinných orgánech, jejich osud v půdě – přechod z frakcí s rychlým obratem do stabilnějších frakcí půdního C (například z rozpuštěné organické hmoty do mikrobiální biomasy a jejích produktů, Obr. 3.4.2a) a průběh jejich ztrát (respiraci). **Kontinuální značení** vyžaduje dlouhou dobu značení rostliny, nejlépe po celou dobu života rostliny až do odběru vzorků. Tak je zajištěno homogenní označení veškeré rostlinné biomasy i jejích produktů. V tomto případě je známo celkové množství asimilovaného C v rostlinné biomase a jeho rozložení odpovídá distribuci rostlinné biomasy. Lze tak dobře odhadnout celkové množství uhlíku transportovaného rostlinou pod zem a zabudovaného do půdy za celou dobu značení. Postupně se mění zastoupení izotopů C v jednotlivých frakcích půdní organické hmoty z původní hodnoty směrem k nové, odpovídající značenému vstupu (Obr. 3.4.2b). Lze také oddělit respiraci pocházející z kořenů a z půdní organické hmoty (Kuzyakov a Domanski 2000). Kontinuální značení ale vyžaduje složitější systém aplikace značeného CO<sub>2</sub> do systému. Většinou se využívají růstové komory nebo otevřené komory a značí se CO<sub>2</sub> připraveným spalováním fosilních paliv ( $\delta^{13}\text{C}$  asi -40‰).

---

*K odhadům vstupu rostlinného materiálu do půdy nebo k oddělení respirace vázané na kořeny a kořenové exsudáty a „novou organickou hmotu“ od respirace uhlíku ze stabilizované původní půdní organické hmoty lze využít také **přenos C<sub>4</sub> rostlin do půdy, na které rostly C<sub>3</sub> rostliny a opačně**. Nejběžnějším příkladem je vysazení kukuřice (C<sub>4</sub> rostlina) do jakékoli půdy, kde se kukuřice dříve nepěstovala. Tento jednoduchý přístup, který je analogií kontinuálního značení, lze ho však aplikovat pouze při studiu několika málo převážně zemědělských plodin (kukuřice, třtina ...).*

---

### 3.4.1 Pulzní značení rostlin pomocí <sup>13</sup>C-CO<sub>2</sub>: podmínky a postup

Pulzní značení se provádí v uzavřené komoře vybavené septem, skrz které lze dávkovat značený CO<sub>2</sub> (viz Obr. 3.4.1) pomocí injekční stříkačky s jehlou nebo v ní případně uvolnit značený CO<sub>2</sub> z pevné látky (např. z Na<sub>2</sub><sup>13</sup>CO<sub>3</sub> přidáním kyseliny). Pro úspěšné označení rostliny a následnou detekci značeného C v půdě je třeba dodržet několik podmínek. Vhodné je zvolit slunný, ale ne příliš horký den, aby rostliny dostatečně fotosyntetizovaly, ale komora se nepřehřívala. Komora by měla být vybavena **účinným mícháním vzduchu**, které zajistí homogenní rozložení značeného CO<sub>2</sub> v prostoru a rychlejší přístup CO<sub>2</sub> do listů. Dále je třeba použít ke **značení CO<sub>2</sub> s výrazně odlišným izotopovým signálem oproti atmosférickému CO<sub>2</sub>**, nejlépe s více jak 90% zastoupením <sup>13</sup>C. Zároveň je potřeba **značit systém dostatečně dlouhou dobu**, aby rostlina alokovala dostatečné (detekovatelné) množství <sup>13</sup>C do kořenů a rhizodepozice. Značený CO<sub>2</sub> je vhodné dávkovat do komory postupně (v několika pulsech) během celé doby značení tak, aby nedošlo k příliš výraznému kolísání jeho koncentrace a tím i rychlosti fotosyntézy. Podle našich zkušeností stačí značit rostliny cca 4 hodiny a značený CO<sub>2</sub> dávkovat např. v intervalech 20-30 minut podle rychlosti jeho spotřeby rostlinami. Po ukončení značení odstraníme komoru.

Ihned po ukončení značení a odstranění komory odebereme vzorky rostlinné biomasy a půdy (popřípadě roztoku, ve kterém je rostlina pěstována) pro stanovení **čisté fixace  $^{13}\text{C}$**  (= součet množství  $^{13}\text{C}$  v rostlinné biomase a půdě ihned po ukončení značení, 100% fixovaného  $^{13}\text{C}$ ). Čistou fixaci lze vyjádřit buď na rostlinu, pokud pracujeme s jednotlivými rostlinami pěstovanými v květináči/roztoku, případně na jednotku plochy ( $\text{m}^2$ ), pokud značíme porost v terénu. Odběr je destruktivní a variabilita mezi vzorky poměrně vysoká, proto je vždy třeba počítat s dostatečným počtem opakování (alespoň 3) na jeden odběr. V případě pěstovaných rostlin odebíráme vždy celé květináče. V terénu pomocí nůžek odebereme nadzemní biomasu ze známé plochy (např. 5x5 cm) a půdní sondou o dostatečném průměru (alespoň 5 cm) pak odebereme pod odstraněnou nadzemní biomasou vzorek půdy s kořeny do předem stanovené hloubky (10-20 cm). Stejným způsobem musíme odebrat i kontrolní vzorky (nezasažené značením) pro zjištění přirozeného výskytu izotopů C (lze provést např. před zahájením značení nebo v jeho průběhu). Dále pak odebíráme značené vzorky v předem daných časových intervalech pro zjištění dynamiky  $^{13}\text{C}$  ve studovaném systému. Pro zjištění exsudace je třeba odebrat vzorky do 24-48 hod po odběru. Naopak pro stanovení konečného rozložení fixovaného C v systému a množství nového C vázaného v půdě je třeba vzorky odebrat po delší době – nejlépe po 2-3 týdnech po označení. Odebrané vzorky udržujeme v chladu a tmě, což způsobí zastavení fotosyntézy a zpomalení respirace, a zpracováváme co nejrychleji, maximálně do 1-2 hodin.

Vzorky zpracováváme následovně. V půdních vzorcích důkladně oddělíme půdu a kořeny, případné zbytky půdy z kořenů omyjeme krátce vodou (roztok můžeme uchovat pro následnou analýzu). Pracujeme kvantitativně, nic nevyhazujeme. Rostliny jsou značeny nehomogenně, proto je třeba odebírat celé rostliny. Pro detailnější analýzu je možné nadzemní i podzemní rostlinnou biomasu rozdělit (např. na stonky a listy nebo různě velké kořeny či rhizomy apod.). Vždy je ale potřeba vzorky zvážit či změřit tak, aby bylo možné dopočítat celek (obsah nového C v celé nadzemní či podzemní biomase).

Se značenými vzorky je nutné pracovat rychle, jednoduché látky jsou rostlinou rychle alokovány a metabolizovány. Pro základní analýzu a odhad čisté fixace a distribuce  $^{13}\text{C}$  stačí vzorky vysušit do konstantní hmotnosti při  $60^\circ\text{C}$ , zvážit, homogenizovat, rozemlít a stanovit koncentraci C a  $\delta^{13}\text{C}$ . **Čistá fixace (100% fixovaného  $^{13}\text{C}$ ) se spočítá jako součet množství  $^{13}\text{C}$  v rostlinné biomase a půdě v systému (květináči, v terénu po přepočtu na jednotku plochy –  $\text{m}^2$ ).** Je třeba počítat s tím, že vinou velkého pozadí C v půdě daného obsahem půdní organické hmoty, **může být změna v jejím izotopovém signálu nedetekovatelná nebo neprůkazná.** Proto je vhodné kromě půdy jako celku analyzovat např. rhizosféru půdy (oddělení rhizosféry od okolní půdy je metodicky dost náročné) nebo analyzovat koncentraci C a  $\delta^{13}\text{C}$  ve frakcích půdní organické hmoty s rychlým obratem, tedy v rozpuštěné organické hmotě a mikrobiální biomase. Za tímto účelem čerstvé (nemražené, nelyofilizované!!!) půdní vzorky extrahujeme ihned po odběru vodou nebo jiným typem extrakčního činidla. Pro stanovení C mikrobiální biomasy se používá 0.05 M síran draselný. Tyto extrakty je před analýzou C a  $\delta^{13}\text{C}$  nutné lyofilizovat nebo vysušit.

### 3.5 Aplikace, případové studie

#### 3.5.1 Pulzní značení rostlin pomocí $^{13}\text{C-CO}_2$

Pro experiment byly použity rostliny zblochanu vodního (*Glyceria maxima*) předpěstované jednotlivě v kelímkách o objemu 300 ml ve směsi luční půdy s pískem. Cílem experimentu bylo porovnat uhlíkovou bilanci nehnojených a hnojených rostlin. Část rostlin byla zalévána pouze dešťovou vodou a část byla přihnojena NPK hnojivem. Rostliny pak byly umístěny do komor a pulzně označeny  $^{13}\text{C-CO}_2$  (99 at%). Komory byly zajištěny proti úniku plynu pomocí vazelíny. Značení probíhalo 4 hodiny, do komory 50x50x50 cm bylo postupně nadávkováno 400 ml plynu (Obr. 3.5.1).



Obr. 3.5.1 Rostliny zblochanu vodního předpěstované v plastových kelímkách, jejich příprava ke značení pomocí  $^{13}\text{CO}_2$  odebíraného z tlakové láhve pomocí injekční stříkačky s jehlou o obsahu 50 ml a umístění do uzavřených komor.

Po ukončení značení byly komory odstraněny. Z komor byly náhodně odebrány hnojené a nehnojené rostliny a zároveň byly zpracovány kontrolní neznačené hnojené a nehnojené rostliny. Další vzorky byly odebírány po 1, 3, 8 a 15 dnech po značení. V každém odběru byly použity 4 opakování. Veškerá nadzemní a podzemní rostlinná biomasa a část dobře homogenizované půdy z každého vzorku byly vysušeny při  $60^\circ\text{C}$  do konstantní hmotnosti (minimálně 48 hodin), zváženy, rozemlety na kulovém mlýnu a analyzovány na obsah celkového C a  $^{13}\text{C}$ .

Množství  $^{13}\text{C}$  v nadzemní a podzemní rostlinné biomase a v půdě bylo vypočítáno následovně:

$$\begin{aligned} &^{13}\text{C v dané části vzorku-půda, kořeny} \dots (\mu\text{g g}^{-1}) \\ &= (\text{at\% vzorek} - \text{at\% kontrola}) / (\text{at\% značícího CO}_2 - 1.10) * \text{množství C} \\ &(\mu\text{g g}^{-1}) \end{aligned}$$

at% vzorek = at%  $^{13}\text{C}$  ve značeném vzorku

at% kontrola = at%  $^{13}\text{C}$  v neznačené kontrole

at% značícího  $\text{CO}_2$  = at%  $^{13}\text{C}$  ve vzduchu v komoře

1.10 = at% přirozeného výskytu  $^{13}\text{C}$  v atmosféře

Čistá fixace byla spočítána pro každý systém rostlina-půda (pro každý květináč) jako součet množství  $^{13}\text{C}$  nalezený v rostlinné biomase a půdě ihned po ukončení značení. Vzorky z dalších odběrů sloužily ke sledování časových změn v distribuci značeného C v systému rostlina-půda, k odhadu exsudace, maximální alokace C do podzemní biomasy a množství C z rhizodepozice stabilizovaného v půdě. Rozdíl mezi čistou fixací  $^{13}\text{C}$  a množstvím  $^{13}\text{C}$  v systému v daném čase reprezentoval jeho ztráty respirací. Distribuce  $^{13}\text{C}$  v systému v jednotlivých odběrech byla vyjadřována relativně, vždy v procentech z čisté fixace (zjištěné v prvním odběru).

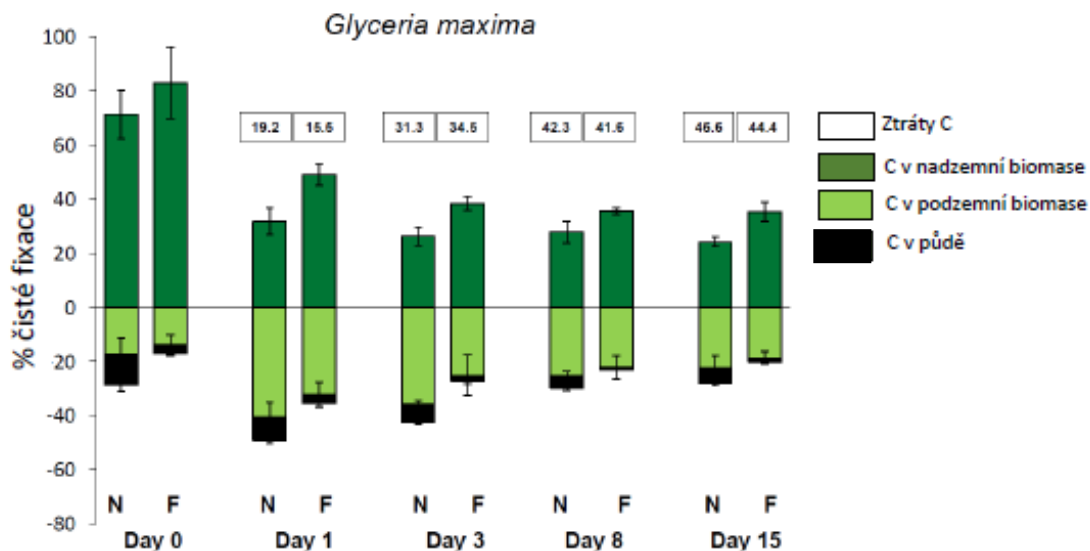
Výsledky ukázaly, že hnojené rostliny byly větší a měly vyšší poměr nadzemní a podzemní biomasy než nehnojené rostliny a díky větší nadzemní biomase fixovaly více  $^{13}\text{C}$  (Tabulka 3.5.1). Relativní ztráty C respirací nebyly hnojením ovlivněny, ale ve shodě s posunem v poměru nadzemní a podzemní biomasy se změnila i distribuce fixovaného C v systému (Tabulka 3.5.1). Hnojené rostliny preferenčně alokovaly fixovaný C do nadzemní biomasy a výrazně méně investovaly do podzemní biomasy. S tím souvisel i výrazný pokles exsudace C do půdy (měřené jako maximální množství  $^{13}\text{C}$ , které je stanoveno v půdě do 48 hod po značení) a nižší množství C, které nakonec v půdě zůstalo vázáno (Obr. 3.5.2). Zároveň je patrné, že bez ohledu na hnojení byl tok uhlíku rostlinou velmi rychlý. Již během čtyř hodin značení bylo značné množství C transportováno do podzemních orgánů a uvolněno do půdy. Maximum alokace C pod zem nastalo do 24 hodin po značení (Obr. 3.5.2).

Jiný pohled na hospodaření rostlin s uhlíkem nabízí vyjádření toků C na množství-váhu kořenové biomasy (tzv. specifické toky). V této studii hnojení neovlivnilo specifický tok C pod zem, ale bylo patrné, že hnojená rostlina si ponechává více C v kořenech (investuje do růstu, zásobních a strukturních látek) a její kořeny ztrácí mnohem méně C exsudací (Tabulka 3.5.2).

Tab. 3.5.1 Váha nadzemní a podzemní rostlinné biomasy nehnojených a hnojených rostlin zblochanu vodního, jejich poměr a čistá fixace  $^{13}\text{C}$ . Hodnoty udávají průměr a směrodatnou odchylku (v závorce, n=4). Výsledky T-testu ukazují vliv hnojení.

	Nehojeno		Hojeno		P
Nadzemní biomasa (g)	0,48	(0,20)	1,39	(0,47)	<0,001
Podzemní biomasa (g)	0,60	(0,31)	1,10	(0,52)	<0,001
Shoot/root poměr	0,83	(0,25)	1,25	(0,34)	<0,001
Čistá fixace $^{13}\text{C}$ ( $\text{mg } ^{13}\text{C}$ rostlina $^{-1}$ )	2,92	(0,43)	8,25	(1,33)	<0,001





Obr. 3.5.2 Časové změny v distribuci  $^{13}\text{C}$  v systému rostlina-půda v průběhu 15 dní po značení pro nehnojený (N) a hnojený (F) systém rostlina-půda.

Tab. 3.5.2 Specifický tok C pod zem, specifická investice do kořenů a specifická exsudace, vyjádřené na váhu podzemní biomasy (průměr a směrodatná odchylka (v závorce), n=4). Výsledky T-testu ukazují vliv hnojení.

	Nehojeno		Hojeno		P
Specifický tok C do podzemní biomasy ( $\mu\text{g } ^{13}\text{C g C root}^{-1}$ )	6,69	(1,26)	7,39	(0,88)	ns
Specifická produkce kořenů ( $\mu\text{g } ^{13}\text{C g C root}^{-1}$ )	2,48	(0,42)	3,35	(0,33)	<0,01
Specifická exudace ( $\mu\text{g } ^{13}\text{C g C root}^{-1}$ )	1,35	(0,28)	0,58	(0,21)	<0,01

### 3.6 Seznam použité literatury

- CHAPIN III S.F. (1980) The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology & Systematics* 11: 233-260.
- HARTMANN A. ET AL. (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant & Soil* 321: 235-257.
- JONES D. L. ET AL. (2009) Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. *Plant & Soil* 321:5–33.
- KUZYAKOV Y. & DOMANSKI G. (2000) Carbon input by plants into the soil. *Journal of Plant Nutrition & Soil Science* 163: 421–431.
- KUZYAKOV Y. (2011) How to link soil C pools with CO<sub>2</sub> fluxes? *Biogeosciences* 8: 1523–1537.
- RASSE D.P. ET AL. (2005) Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilization. *Plant & Soil* 269: 341-356.

## 4 PRIMING EFEKT

Eva Kaštovská

### 4.1 Priming efekt a jeho dělení

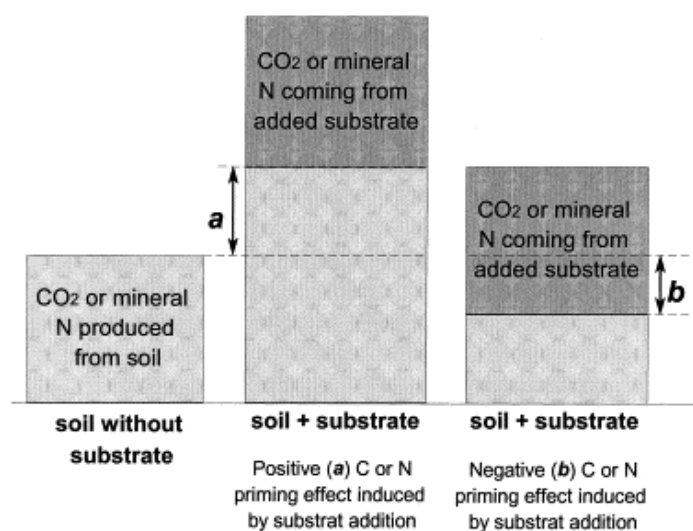
Vstup organického materiálu do půdy zpravidla vede ke zvýšení mineralizace půdní organické hmoty, provázené zvýšenou produkcí  $\text{CO}_2$  a minerálních forem dusíku ( $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$ ) oproti kontrolním půdám. Tento jev byl popsán již v roce 1926 (Löhnis 1926) a později nazván “**priming efekt**” (Broadbend 1947; Broadbend a Bartolomew 1948; Bingemann *et al.* 1953 a další). Priming efekt nikdy nebyl pozorován za sterilních podmínek, jeho výskyt tedy úzce souvisí s aktivitou půdních mikroorganismů. Může zde hrát roli mikrobiální kompetice o živiny, limitace dusíkem, mikrobiální diverzita, činnost živých kořenů i další faktory.

Dnes je priming efekt definován širěji jako **krátkodobá změna v obratu půdní organické hmoty (POH) způsobená zásahem do půdy** (Kuzyakov *et al.* 2000). Takovým zásahem může být například přidavek nízkomolekulárních látek jako je glukóza, fruktóza nebo aminokyseliny, aplikace vysokomolekulárních látek jako jsou rezidua rostlin (kořeny, listy, organická hnojiva), vstup kořenových exudátů, exkrementů nebo výměšků půdní fauny, hnojení minerálními hnojivy, závlahy či mechanické ošetření půdy. Priming efekt byl pozorován nejen pro C a N, ale i pro další prvky- například pro síru a fosfor.

**Priming efekt je významný jev z pohledu modelování bilance, obratu a zásob POH.** Existence priming efektu ukazuje, že dekompozice POH není konstantní a závislá pouze na faktorech prostředí, především teplotě a vlhkosti, jak je uvažováno ve většině modelů. Skrze priming efekt ji ovlivňuje také velikost mikrobiálního společenstva, jeho složení, fyziologický stav a dynamika. Jeho následkem se do půdy během relativně krátké doby (několik dnů či týdnů) uvolní velké množství dostupného uhlíku a živin ze stabilizované organické hmoty a dále ovlivňuje chování všech složek půdního ekosystému.

Častěji je popisován **pozitivní priming efekt**, kdy po zásahu do půdy dochází ke stimulaci mineralizace POH aktivací mikrobiálního společenstva. Nastat ale může i opačný jev, tedy **negativní priming efekt**, kdy je pozorován pokles mineralizace POH (Obr. 4.1.1). Bývá pozorován po hnojení půd minerálním hnojivem, kdy často dochází k celkovému poklesu mikrobiální aktivity a zvýšení efektivity mikrobiálního metabolismu. Negativní priming ale může být pozorován i po přidavku snadno dostupného substrátu, zejména v půdách bohatých živinami a limitovaných uhlíkem. Mikroorganismy pak přijímají přidaný snadno dostupný substrát přednostně před půdní organickou hmotou (preferenční využití substrátu), jejíž dekompozice se tak sníží.

Pozor, na priming efekt nemůže být usuzováno pouze z měření produkce CO<sub>2</sub> z půdy. Po přidavku organického substrátu do půdy vždy dochází k nárůstu produkce CO<sub>2</sub> z půdy. Tento nárůst však nemusí být způsoben zvýšenou mineralizací POH. Uvolněný CO<sub>2</sub> vždy pochází z části z dodané organické látky a z části z POH. Podíl obou zdrojů lze stanovit pouze s využitím značeného substrátu (přidaný substrát musí mít jiné zastoupení izotopů C (stabilních či radioaktivních) než POH).

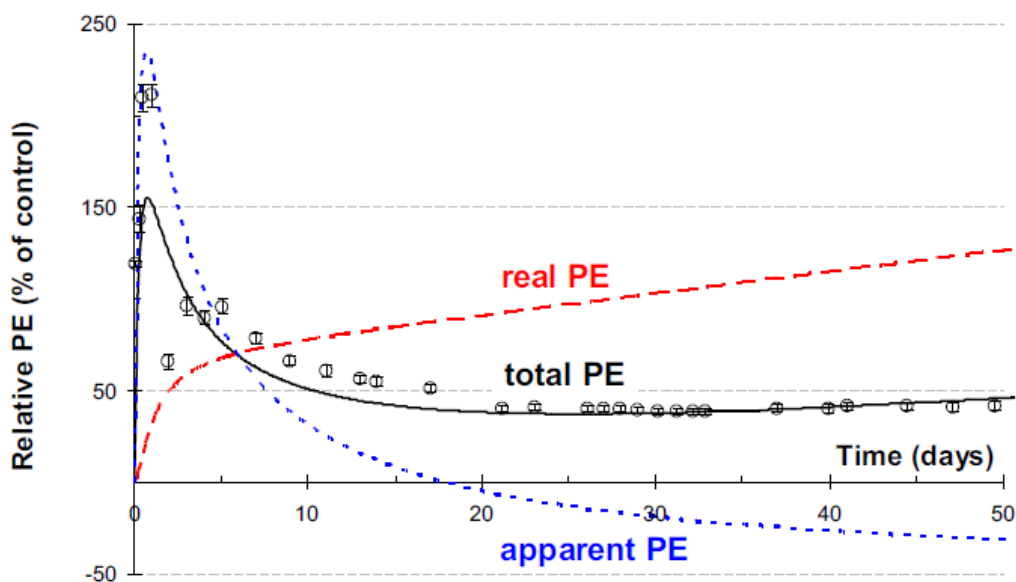


Obr. 4.1.1 Znázornění **pozitivního (a) a negativního (b) priming efektu pro C či N** po přidavku substrátu do půdy (podle Kuzyakov *et al.* 2000).

Priming efekt je v půdě častým jevem, vázaným zejména na místa s vysokou mikrobiální aktivitou, tzv. „hotspots“. Typickým prostředím je především **rhizosféra**, kde kořeny rostlin v závislosti na fotosyntetické aktivitě zajišťují téměř kontinuální přísun snadno rozložitelného substrátu – organických látek s vysokým C/N poměrem. Mnohé studie potvrdily v přítomnosti živých kořenů zvýšenou aktivitu mikroorganismů, rychlý obrat mikrobiální biomasy a zvýšenou dekompozici POH, tedy **rhizosférní priming efekt** (Blogodatskaya *et al.* 2009; Cheng 2009 a další). Dalšími prostředím jsou **detritosféra** – specifické prostředí, vytvářející se v rostlinném opadu nahromaděném na povrchu půdy, kde může být priming efekt spojen s uvolňováním snadno dostupných organických sloučenin při dekompozici rostlinného opadu (Fontaine *et al.* 2007) či **drilosféra**, půda ovlivněná činností půdních živočichů – převážně žížal, zahrnující chodbičky pokryté výměškou a slizem a „půdu“ změněnou průchodem trávicím traktem půdních živočichů (Brown 1995). Právě obohacení půdy o snadno dostupné organické sloučeniny živočišného původu může vyvolat priming efekt.

Uhlík (nebo dusík) uvolněný při priming efektu může v principu pocházet ze dvou zdrojů: z mikroorganismů jako takových nebo z půdní organické hmoty (myšleno z již přeměněných a stabilizovaných organických sloučenin). Podle zdroje uvolněného CO<sub>2</sub> lze priming efekt označit za **zdánlivý (apparent)**, pokud je zvýšená produkce CO<sub>2</sub> výsledkem aktivace mikroorganismů a zvýšeného mikrobiálního obratu a nesouvisí s obratem stabilní půdní organické hmoty (Blagodatskaya a Kuzyakov 2008) nebo **skutečný (real)**, kdy dojde k ovlivnění rozkladu stabilní půdní organické hmoty. Zásadní vliv na velikost i typ priming efektu má velikost a charakter přídatku. Obecně platí, že velikost priming efektu roste s množstvím přidaného substrátu a zároveň je větší v půdách bohatých na POH a živiny než v půdách chudých. Vzhledem k očekávanému vlivu přídatku substrátu je výhodné jeho množství vyjádřit vzhledem k množství C vázaného v mikrobiální biomase (Blagodatskaya a Kuzyakov 2008).

- Pokud je množství přidaného C významně menší než obsah mikrobiálního uhlíku (do 15%, 5-50 μg C g<sup>-1</sup> půdy), dochází pouze k aktivaci mikroorganismů a k rychlému a velmi krátkodobému zvýšení respirace. Množství extra uvolněného CO<sub>2</sub> bývá menší než mikrobiální biomasa. Jedná se pouze o zdánlivý priming.
- Pokud je množství přidaného C srovnatelné s uhlíkem vázaným v mikrobiální biomase, přídatek působí změny v aktivitě mikroorganismů a rychlosti obratu, ale většinou nevyvolá jejich růst a opět vyvolá pouze zdánlivý priming.
- Pokud množství přidaného C významně převyšuje obsah mikrobiálního uhlíku, pak dodaný substrát nejprve stimuluje mikrobiální aktivitu (zdánlivý priming) a poté vyvolá růst mikrobiálního společenstva a skutečný, dlouhodobější priming efekt vyvolaný potřebou získat živiny, které limitují růst (Obr. 4.1.2).



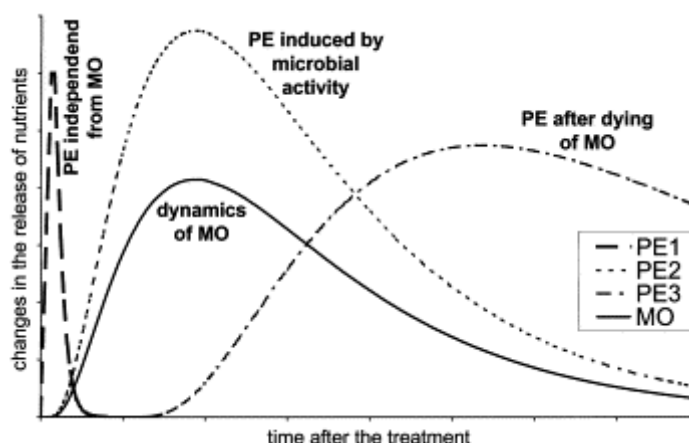
Obr. 4.1.2 Dynamika zdánlivého a skutečného priming efektu a jejich příspěvek k celkovému priming efektu po přidavku glukózy do půdy (vyjádřenému jako % respirace z kontrolní půdy), model (podle Kuzyakov 2010).

*Ověřit, zda je sledovaný priming zdánlivý či skutečný lze pouze sledováním dynamiky půdní mikrobiální biomasy souběžně s měřením mineralizace uhlíku. Růst biomasy, na*

kterém se podílí i uhlík z POH je důkazem zvýšené dekompozice POH. Dalším podpůrným měřením může být stanovení aktivity extracelulárních enzymů, kdy při jejím významném navýšení můžeme usuzovat na výskyt skutečného priming efektu.

## 4.2 Dynamika priming efektu

**Priming efekt je dynamický jev**, který souvisí se změnami v aktivitě a růstu mikroorganismů po zásahu do půdy (Obr. 4.2.1). Délka jeho trvání je stále otevřenou otázkou, protože většina studií je poměrně krátkodobých či jednorázových. Zdánlivý priming efekt se objevuje v podstatě okamžitě po zásahu, kdy dochází k nabuzení mikrobiální aktivity - respirace (Obr. 4.2.1, křivka PE1). Pokud je k dispozici dostatek substrátu, následuje během 1-2 dnů růst mikrobiální biomasy, spojený s výrazným skutečným priming efektem – tedy zvýšenou dekompozicí půdní organické hmoty, jehož cílem je získat z živiny potřebné pro stavbu nových buněk (Obr. 4.2.1, křivka PE2). Po vyčerpání přidaného substrátu dochází k limitaci růstu mikroorganismů a k jeho zastavení. Poté začnou mikroorganismy postupně umírat. Jejich těla pak opět představují vstup snadno dostupného substrátu pro přeživší a zvýšený rozklad POH pak může přetrvávat i několik týdnů po přidavku původního substrátu (Obr. 4.2.1, křivka PE3). Dynamiku mikrobiální odpovědi na substrát a s tím spojené změny v průběhu priming efektu je třeba brát v úvahu při plánování experimentu (velikost přidavku substrátu vzhledem k mikrobiální biomase, načasování odběru vzorků) a interpretaci výsledků.

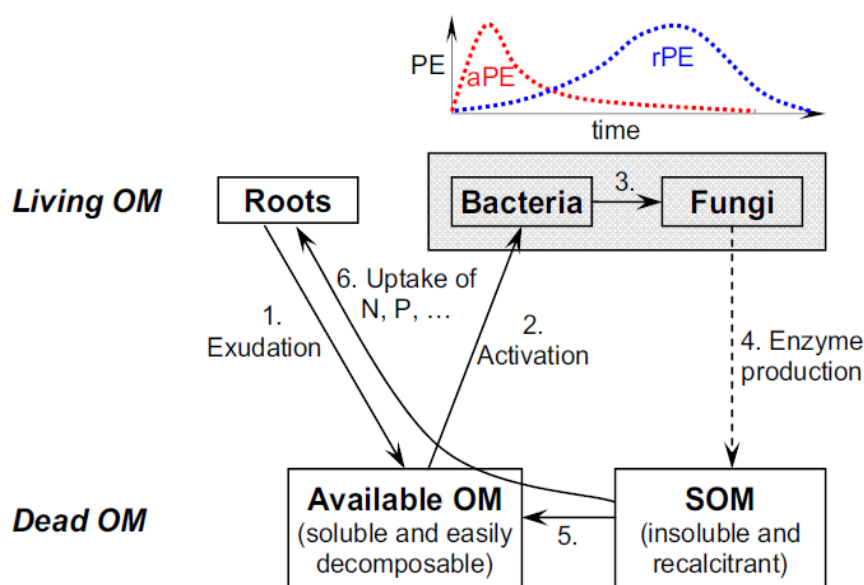


Obr. 4.2.1 Dynamika priming efektu (PE) v souvislosti s růstem mikrobiálního společenstva (MO). Křivka PE1 představuje zdánlivý priming efekt, spojený s nabuzením respirace mikroorganismů přidaným substrátem. Posléze mikroorganismy začínají růst a k tomu potřebují kromě dodaného C také ostatní živiny, které získávají zvýšeným rozkladem půdní organické hmoty – dochází ke skutečnému primingu (křivka PE2). Po vyčerpání přidaného substrátu mikroorganismy přestávají růst a odumírají. Substrát a živiny z jejich těl pak vyvolávají opět skutečný priming efekt (křivka PE3) (podle Kuzyakov *et al.* 2000).

## 4.3 Mechanismus vzniku priming efektu

Na příkladu rhizosférického priming efektu bude dále popsán mechanismus jeho vzniku (Obr. 4.3.1). Rostliny vylučují do půdy asi 15-25% z celkového asimilovaného uhlíku prostřednictvím kořenových exsudátů – směsi jednoduchých sacharidů, organických kyselin a aminokyselin a dalších látek (1. Exsudace). Rhizodepozice představuje významný zdroj snadno rozložitelného uhlíku (ostatních živin je ve vylučovaných

sloučeninách poměrně málo), který využívají rhizosféřní mikroorganismy k získání energie, růstu a reprodukci (2. Aktivace mikrobiálního společenstva). Zvýšená potřeba dusíku, fosforu a dalších živin pro růst a stavbu buněk vyvolává **silnou konkurenci o živiny** mezi kořeny rostlin a rhizosféřními mikroorganismy i v rámci samotného mikrobiálního společenstva (3.) Mikroorganismy proto **zvyší produkci extracelulárních rozkladných enzymů** (4.) a to má za následek **vyšší dekompozici stabilizované půdní organické hmoty** (5.), z níž se **uvolňuje dusík, fosfor a další živiny v dostupných formách**. Ty pak mohou být přijímány půdními mikroorganismy i kořeny rostlin (6.) (Fontaine *et al.* 2003).



Obr. 4.3.1. Mechanismus vzniku priming efektu v rhizosféře. Kořeny rostlin vylučují exsudáty (1), snadno rozložitelné organické látky, které aktivují mikrobiální společenstvo (2). Zvýšená potřeba živin k zajištění mikrobiálního růstu vyvolává silnou konkurenci mezi mikroorganismy navzájem i mezi mikroorganismy a kořeny (3). Mikroorganismy proto začínají ve zvýšené míře produkovat extracelulární enzymy (4), které rozkládají komplexní stabilizovanou POH na jednodušší sloučeniny (5) a uvolňují živiny ve formách dostupných pro kořeny rostlin i mikroorganismy (6). Aktivace mikrobiálního společenstva se projeví jako zdánlivý priming efekt (aPE), který se po indukcii růstu a produkce extracelulárních enzymů změní ve skutečný (rPE), jak je ukázáno v křivce v levém horním rohu (podle Kuzyakov 2010).

#### 4.4 Měření priming efektu: princip a výpočty

**Jak kvantifikovat priming efekt?** Princip je následující. Mikroorganismy v půdě využívají k energetickému metabolismu uhlík z POH a respirovaný uhlík v  $\text{CO}_2$  má proto izotopové složení přibližně rovné izotopovému složení POH. Pokud do půdy přidáme další organickou látku, mikroorganismy budou pro respiraci využívat oba dva substráty v závislosti na jejich dostupnosti a rozložitelnosti. Pokud bude mít přidaný substrát výrazně odlišné izotopové složení od POH, budeme schopni na základě izotopového složení uvolněného  $\text{CO}_2$  stanovit podíl obou dostupných zdrojů C na respiraci (Obr. 4.3.1). Porovnáním rychlostí respirace uhlíku z POH z půdy po přidavku substrátu a z

kontrolní půdy neovlivněné přidavkem pak stanovíme, zda zásah ovlivnil mineralizaci POH (viz Obr. 4.1.1).

Podrobněji k výpočtům. Celkové množství uhlíku uvolněného z půdy jako CO<sub>2</sub> (C-CO<sub>2</sub>) po přidavku substrátu ( $m_3$ ) lze stanovit pomocí plynového chromatografu. Ze zákona o zachování hmotnosti vyplývá, že toto množství se rovná součtu množství uhlíku pocházejícího z POH ( $m_1$ ) a z přidaného substrátu ( $m_2$ ):

$$m_1 + m_2 = m_3 \quad 4.4.1$$

---

*Parametry  $m$  lze použít buď v absolutních jednotkách ( $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$  nebo  $\mu\text{mol C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$  půdy), nebo relativně, jako podíly obou zdrojů C na respiraci, kde  $m_3$  bude rovno 1 (pro bezrozměrnou škálu  $m_1$  a  $m_2$  od 0 do 1) nebo 100% (pro  $m_1$  a  $m_2$  v procentech).*

---

Izotopové složení obou zdrojů C, POH ( $\delta^{13}\text{C}_1$ ) a přidaného substrátu ( $\delta^{13}\text{C}_2$ ), a produktu respirace - CO<sub>2</sub> uvolněného z půdy po přidavku substrátu ( $\delta^{13}\text{C}_3$ ), lze stanovit pomocí hmotnostní spektrometrie. Izotopové složení produktu musí ležet mezi  $\delta^{13}$  obou zdrojů a bude záviset na podílu těchto zdrojů C na respiraci. K jejich výpočtu použijeme směšovací rovnici (obr. 4.4.1):

$$m_1 * \delta^{13}\text{C}_1 + m_2 * \delta^{13}\text{C}_2 = m_3 * \delta^{13}\text{C}_3 \quad 4.4.2$$

Z první rovnice vyjádříme  $m_2$ , tedy množství C uvolněné respirací z přidaného substrátu (viz 4.4.3) a dosadíme do směšovací rovnice. Po úpravě této rovnice získáme výpočet  $m_1$ , tedy množství (případně podíl) respirovaného C pocházející z POH (4.4.4).

$$m_2 = m_3 - m_1 \quad 4.4.3$$

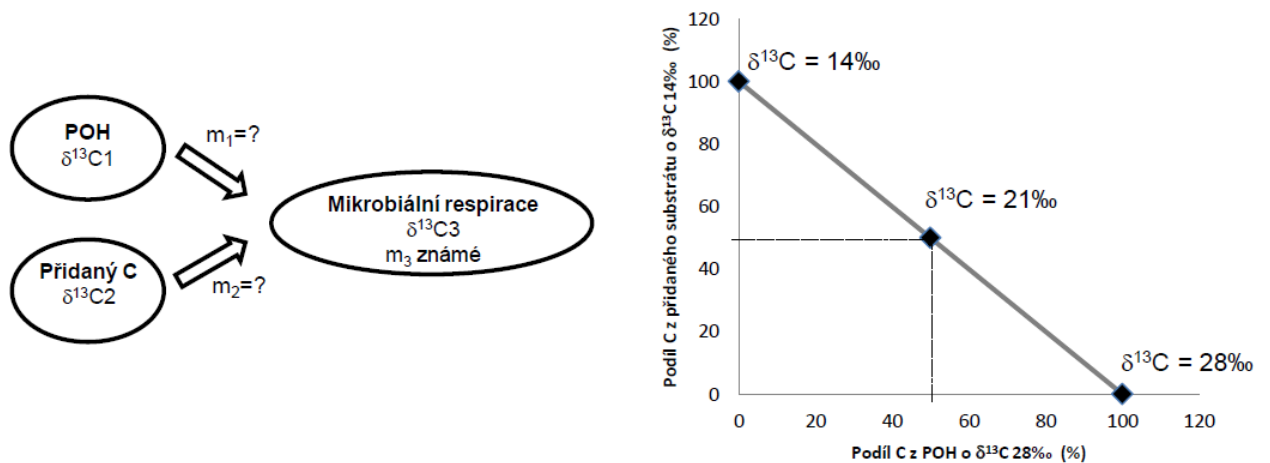
$$m_1 = (m_3 * \delta^{13}\text{C}_3 - m_3 * \delta^{13}\text{C}_2) / (\delta^{13}\text{C}_1 - \delta^{13}\text{C}_2) \quad 4.4.4$$

Priming efekt se pak vypočítá z rozdílů v respiraci kontroly (= přidavkem neovlivněné půdy, kde veškerý uvolněný CO<sub>2</sub> pochází pouze z POH) a množství C vyrespirovaného z POH z půdy po přidavku substrátu ( $m_1$ ). Lze ho vyjádřit jako **kumulativní priming efekt** (extra množství C-CO<sub>2</sub> uvolněného z POH z půdy po přidavku za celou dobu inkubace, rovnice 4.4.5) nebo jako **relativní priming efekt** (v % původní respirace kontrolní půdy, rovnice 4.4.6).

$$\text{PE}_{\text{kumulativni}} = m_1 - m_{\text{kontrola}} \quad 4.4.5$$

$$\text{PE}_{\text{relativni}} = (m_1 - m_{\text{kontrola}}) / m_{\text{kontrola}} \quad 4.4.6$$





Obr. 4.4.1 Aplikace směšovací rovnice pro rozlišení podílu dvou zdrojů C o různém izotopovém složení (půdní organické hmoty a přidaného substrátu) na výsledné mikrobiální respiraci. Izotopové složení výsledné mikrobiální respirace leží mezi  $\delta^{13}\text{C}$  obou zdrojů a závisí na jejich příspěvku k celkové respiraci (vpravo uveden příklad, kdy podíl obou zdrojů na celkové respiraci je 50%).

## 4.5 Aplikace, případové studie

### 4.5.1 Porovnání priming efektu po přidavku dvou různých substrátů

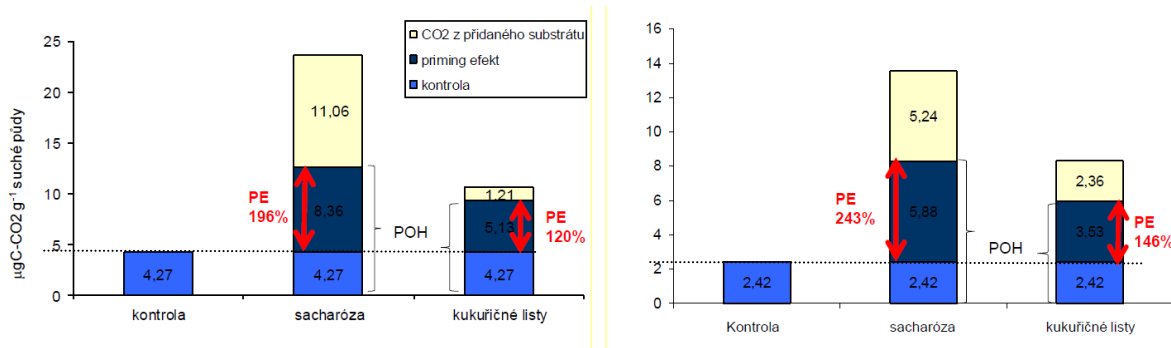
Ve studii byl sledován priming efekt vyvolaný **přídavkem sacharózy** (disacharid složený z glukózy a fruktózy, představující jednoduchý snadno rozložitelný, vysoce energeticky bohatý zdroj bez obsahu dusíku) a **kukuřičných listů** (komplexní substrát obsahující kromě jednodušších látek i makromolekuly, po rozkladu představující zdroj uhlíku i dusíku) ve dvou různých **půdách, organické a minerální**. Priming efekt byl stanoven jednorázově, 24 hodin po přidavku substrátů v koncentraci vždy 0,5% (w/w).

Po přidavku substrátů do půdy (20 g čerstvé půdy) a důkladné homogenizaci byly vzorky plynotěsně uzavřeny a inkubovány spolu s kontrolními vzorky půd bez přidavku přibližně 24 hodin ve 20°C. Poté byla pomocí plynové chromatografie stanovena koncentrace  $\text{CO}_2$  v plynném objemu vzorků a vypočítána rychlost respirace půdy (Tab. 4.5.1.1). Zde bylo zjištěno, že **oba substráty významně zvýšily rychlost respirace půdy**. Dále bylo pomocí hmotnostní spektrometrie (IR-MS) stanoveno izotopové složení obou půd ( $\delta^{13}\text{C}$  organické půdy -26,11‰,  $\delta^{13}\text{C}$  minerální půdy -26,05‰), obou přidávaných substrátů ( $\delta^{13}\text{C}$  sacharózy -11,86‰,  $\delta^{13}\text{C}$  kukuřičných listů -14,73‰) a  $\text{CO}_2$  uvolněných ze všech inkubovaných vzorků (Tab. 4.5.1.1). Pomocí směšovací rovnice byl vypočítán podíl uhlíku z POH a přidaného substrátu na celkové respiraci a odpovídající rychlosti respirace (Tab.4.5.1.1).

Tab. 4.5.1.1 Kumulativní mikrobiální respirace za 24 hodin ( $\mu\text{gC g}^{-1}$  suché půdy) v organické a minerální půdě v kontrolní variantě a variantách obohacených sacharózou nebo kukuřičnými listy a její izotopový signál ( $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ ). Dále jsou uvedeny podíly respirace pocházející z přidaného substrátu a POH na celkové respiraci (%) a odpovídající množství C-CO<sub>2</sub> uvolněná z obou zdrojů za 24 hodin.

Typ půdy	Varianta přídavku	Celková respirace	$\delta^{13}\text{C-CO}_2$	Respirace z přídavku		Respirace z POH	
Organická	Kontrola	4,27±0,11	-30,23±0,40	-	-	4,27±0,11	100%
	Sacharóza	23,65±0,10	-19,47±0,05	11,02±0,13	47%	12,63±0,03	53%
	Kukuřičné listy	10,61±0,06	-24,80±0,40	1,21±0,37	11%	9,39±0,43	89%
Minerální	Kontrola	2,42±0,03	-29,63±0,37	-	-	2,42±0,03	100%
	Sacharóza	12,94±0,22	-20,30±0,08	5,24±0,14	41%	7,70±0,12	59%
	Kukuřičné listy	8,29±0,18	-22,83±0,12	2,36±0,13	29%	5,93±0,09	71%

Výsledný priming efekt byl vždy spočítán jako rozdíl respirace pocházející z POH mezi kontrolním vzorkem a vzorkem s přidaným substrátem a vyjádřen relativně jako procentický nárůst rychlosti respirace oproti kontrole (Obr. 4.5.1.1).



Obr. 4.5.1.1 Kumulativní mikrobiální respirace z organické a minerální půdy – kontrolní varianty a variant s přídavkem sacharózy a kukuřičných listů. U variant s přídavkem je odlišena respirace z přidaného substrátu. Respirace pocházející z POH je pro názornost rozdělena respiraci odpovídající kontrolní půdě a extra respiraci z POH vyvolanou přídavkem dalšího substrátu – tedy odpovídající pozitivní priming efektu. Graf vlevo ukazuje výsledky experimentu s organickou půdou, vpravo s minerální.

Výsledky studie ukázaly následující:

- CO<sub>2</sub> uvolněný respirací z obou kontrolních půd je ochuzený o izotop <sup>13</sup>C ve srovnání se substrátem využívaným mikroorganismy k respiraci (myšleno POH)
- Oba substráty zvýšily respiraci půdy a indukovaly pozitivní priming efekty (Obr. 4.5.1.1)

- V obou půdách vyvolala vyšší priming efekt sacharóza ve srovnání s kukuřičnými listy a zároveň byla více využívána mikroorganismy pro respiraci (cca 40% uvolněného CO<sub>2</sub>). Podíl C z kukuřičných listů na respiraci byl nižší, nepřesáhl 30% respirace (Tab. 4.5.1.1). Důvodem může být, že sacharóza je jednodušším substrátem než kukuřičné listy a je proto rychleji dostupná pro mikrobiální metabolismus. Zároveň neobsahuje dusík, takže uhlík z ní nemůže být efektivně zabudován do mikrobiální biomasy a je tedy využíván především k získání energie. Zvýšená potřeba dusíku pro eventuelní mikrobiální růst musí být pokryta zvýšenou dekompozicí POH, což je spojeno s vyšším priming efektem.
- Respirace z organické půdy byla vyšší, což pravděpodobně souvisí s vyšší mikrobiální biomasou (bývá v korelaci s obsahem POH), ale relativní priming efekty byly nižší v případě obou substrátů – lze uvažovat nad jiným složením mikrobiálního společenstva – jeho jiným C/N poměrem, zastoupením hub a bakterií, r- a K-strategů, rozdílnou diverzitou a tedy rozdílnou aktivitou a potřebou dusíku.

#### 4.6 Seznam použité literatury

- BINGEMANN C.W. ET AL. (1953) The effect of the addition of organic materials on the decomposition of an organic soil. *Soil Science Society of America Proceedings* 17: 34-38.
- BLAGODATSKAYA E. & KUZYAKOV Y. (2008) Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biology & Fertility of Soils* 45: 115-131.
- BLAGODATSKAYA E.V. ET AL. (2009) Contrasting effects of glucose, living roots and maize straw on microbial growth kinetics and substrate availability in soil. *European Journal of Soil Science* 60: 186-197.
- BROADBENT F. E. & BARTHOLOMEW W.V. (1948) The effect of quantity of plant material added to soil on its rate of decomposition. *Soil Science Society of America Proceedings*, 13: 271-274.
- BROADBENT F. E. (1947) Nitrogen release and carbon loss from soil organic matter during decomposition of added plant residues. *Soil Science Society of America Proceedings*, 12: 246-249.
- BROWN G.G. (1995) How do earthworms affect microbial and faunal community diversity. *Plant & Soil* 170: 209-231.
- CHENG W. (2009) Rhizosphere priming effect: Its functional relationships with microbial turnover, evapotranspiration, and C-N budgets. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 1795-1801.
- FONTAINE S. ET AL. (2003) The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology & Biochemistry* 35: 837-843.
- FONTAINE S. ET AL. (2007) Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450: 277-U10
- KUZYAKOV Y. (2010) Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 1363-1371.
- KUZYAKOV Y. ET AL. (2000) Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1485-1498.
- LÖHNIS F. (1926) Nitrogen availability of green manures. *Soil Science* 22: 253-333.

## II. DUSÍK

### 5 IZOTOPOVÁ FRAKCIONACE DUSÍKU V EKOSYSTÉMU

Hana Šantrůčková

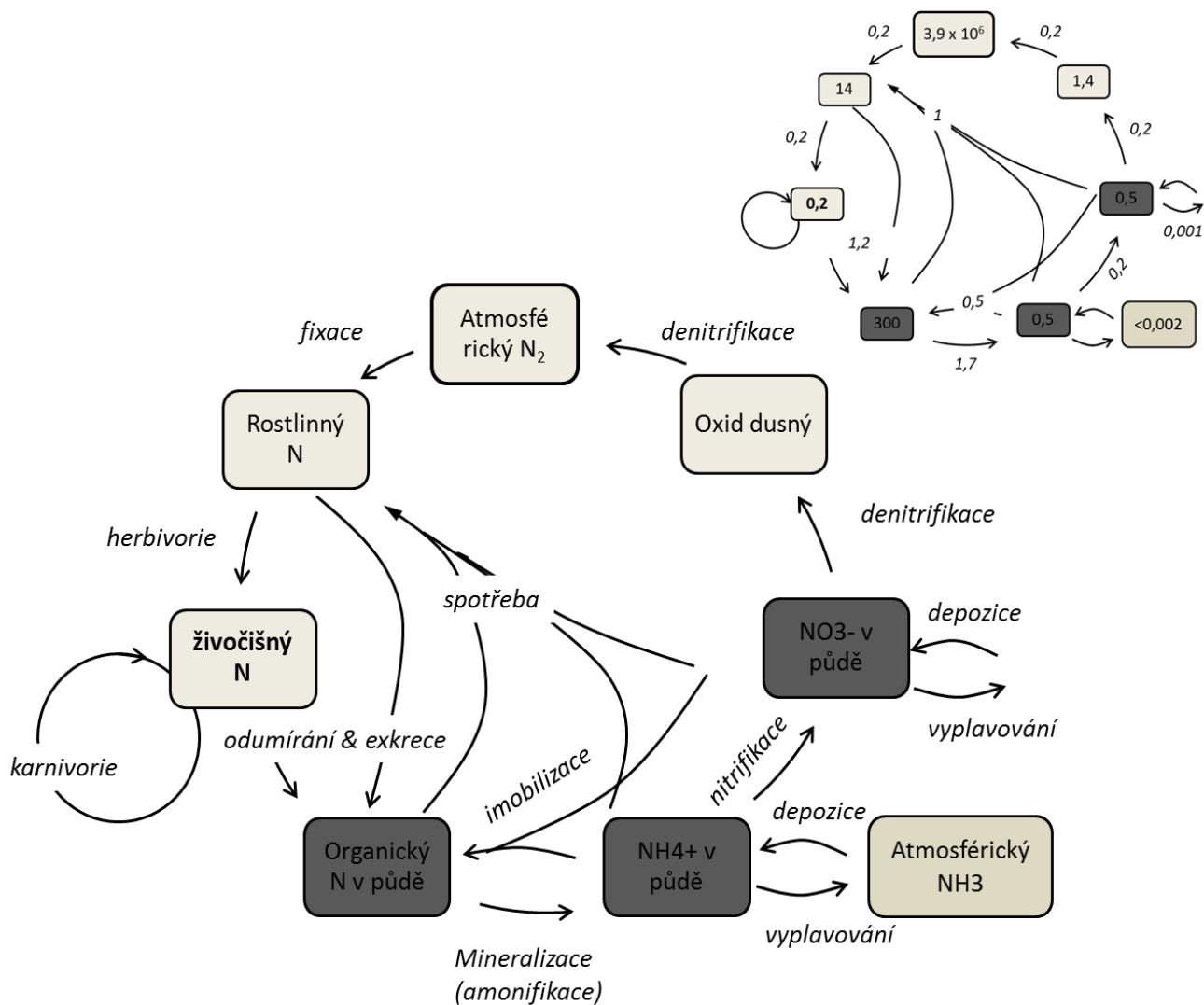
#### 5.1 Koloběh dusíku v suchozemském ekosystému

Největší zásobárnou dusíku je atmosféra, kde je obsaženo 78 % molekulárního dusíku. V molekule dusíku jsou dva atomy N spojené pevnou trojnou vazbou, která způsobuje nízkou reaktivitu  $N_2$ . S jinými sloučeninami  $N_2$  reaguje pouze za vysokých teplot a tlaku. Prokaryotní organismy (bakterie a sinice) jsou však schopny enzymaticky štěpit (enzym nitrogenáza) trojnou vazbu v molekule  $N_2$  a dusík zabudovat do amonných iontů a organických látek (Obr. 5.1.1). Zajišťují tak primárně vstup N do půdy a jsou proto klíčovými organismy koloběhu N v přírodě. Amonné ionty a organické látky jsou zdrojem dusíku pro rostliny, které jsou zdrojem potravy pro býložravce, nebo po svém odumření vstupují do dekompozičních potravních řetězců v půdě. Půdní organismy přijímají dusíkaté organické látky, transformují je na jednodušší organické látky nebo na minerální formy N a část zabudují do vlastní biomasy. Přebytečný N vyloučí zpět do půdy ve formě amoniaku ( $NH_4^+$ ), močoviny nebo jednoduchých organických meziproduktů metabolismu. Močovina je v půdě rychle přeměněna na amoniak, jednoduché organické monomery jsou spotřebovávány rostlinami i mikroorganismy. Pokud je dusík vyloučen ve formě  $NH_4^+$ , mluvíme o mineralizaci nebo také amonifikaci organických látek. Amonné ionty jsou buď přijímány rostlinami a mikroorganismy a zabudovány do biomasy (imobilizace), nebo jsou v procesech nitrifikace přeměněny nitrifikačními bakteriemi na nitrity a potom na nitráty ( $NO_3^-$ ). V zásaditých půdách se dost významná část amoniaku uvolní v plynné podobě do atmosféry. Nitráty jsou podobně jako amonné ionty přijímány rostlinami a mikroorganismy pro tvorbu biomasy (imobilizace). Kromě toho je mohou využívat denitrifikační bakterie a houby v energetickém metabolismu jako akceptor elektronů a postupně nitráty redukují v procesech denitrifikace přes oxid dusný zpět na  $N_2$ . Přebytek nitrátů je z půdy vyplavován. Amoniak a nitráty se, vedle uvolňování v biologickém koloběhu, mohou do půdy dostávat depozicemi z atmosféry. Složitost přeměn N v půdě je spojena s tím, že se dusík v přírodě může vyskytovat ve všech svých oxidačních stavech (-III až +V). Je mikroorganismy využíván jako donor i akceptor elektronů v oxidačně redukčních reakcích.

Obrovská funkční diverzita půdních mikroorganismů a současně obrovská heterogenita půdního prostředí způsobuje, že v půdě mohou probíhat všechny přeměny současně. Například  $NH_4^+$ , který vzniká amonifikací je současně přeměňován nitrifikačními bakteriemi na  $NO_3^-$  nebo imobilizován do biomasy. Podobně  $NO_3^-$  vznikající nitrifikací může být souběžně přeměňován na oxid dusný a  $N_2$  v procesu denitrifikace, nebo zpět na  $NH_4^+$  (disimilativní redukce nitrátu, proces méně významný než denitrifikace, není uveden v obr. 5.1.1), nebo imobilizován do biomasy. Proto měření koncentrace jednotlivých forem dusíku nedá informaci o skutečné rychlosti procesů, které v půdě probíhají. Každý z výše uvedených procesů, kromě fixace  $N_2$ , je provázen izotopovou diskriminací proti těžkému izotopu  $^{15}N$ . Kombinace hmotnostní bilance s izotopovou bilancí by tak mohla pomoci stanovit rychlost jednotlivých procesů.

Vzhledem ke složitosti procesů a časté limitaci N je využití přirozeného výskytu stabilního izotopu  $^{15}\text{N}$  pro stopování osudu N v suchozemském ekosystému omezeno (viz níže). Častěji se používá značení těžkým izotopem  $^{15}\text{N}$ , kdy se označí buď reaktant a sleduje se výskyt  $^{15}\text{N}$  v produktech nebo se označí produkt reakce a sleduje se rychlost ředění izotopového signálu  $^{15}\text{N}$  v produktu (tzv. pool dilution technique - viz kapitola 6).

V této kapitole se zaměříme na (i) diskriminaci  $^{15}\text{N}$  spojenou s jednotlivými procesy transformace N v půdě a na případové studie zaměřené na (ii) vysvětlení posunu v izotopovém signálu  $^{15}\text{N}$  v biomech světa od jihu k severu, (iii) použití přirozeného výskytu  $^{15}\text{N}$  pro odhad fixace  $\text{N}_2$  a (iv) příspěvku mykorhizních hub k výživě rostlin dusíkem.



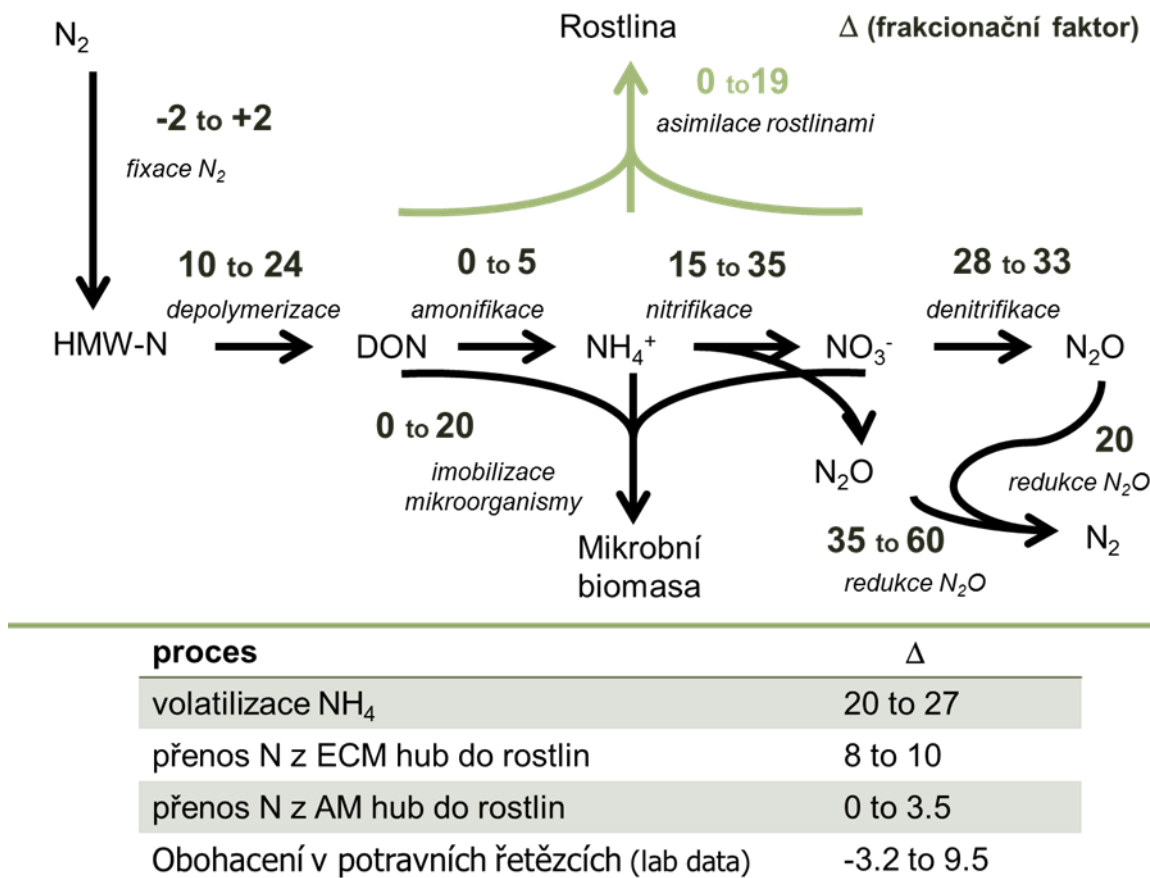
Obr 5.1.1 Koloběh dusíku v suchozemském ekosystému. Ve schématu jsou uvedeny pouze nejdůležitější zásobníky a toky. V pravém rohu obrázku jsou vyčísleny velikosti jednotlivých zásobníků v Pg a toků v  $\text{Pg rok}^{-1}$  ( $1\text{Pg} = 1\text{Gt} = 10^{15}\text{g}$ ).

## 5.2 Diskriminace $^{15}\text{N}$ spojená s transformací N

Izotopový signál půdy  $\delta^{15}\text{N}$  je variabilní. Obecně ale můžeme napsat, že půda bývá obohacena o  $^{15}\text{N}$  v porovnání s atmosférickým dusíkem. Čím starší půda, nebo čím hlouběji do půdního profilu, tím se zvyšuje obsah  $^{15}\text{N}$ .

Každý proces přeměny N v biologickém koloběhu je spojen s větší či menší diskriminací  $^{15}\text{N}$  (Obr. 5.2.1). Nejmenší, prakticky nulová diskriminace je spojena s fixací atmosférického N enzymem nitrogenázou, který katalyzuje redukci  $\text{N}_2$ . Všechny ostatní procesy vedou v podmínkách, kde není limitace substrátem, k ochuzení produktu o těžký izotop  $^{15}\text{N}$ . Procesy nitrifikace a denitrifikace jsou spojeny s významnou diskriminací a produkty jejich metabolismu,  $\text{NO}_3^-$  a oxidy dusíku jsou ochuzené o  $^{15}\text{N}$ . Protože tyto produkty se snadno z půdy ztrácejí buď vyplavováním nebo volatilizací, tak celkový N, který v půdě zůstává, bývá obohacený o  $^{15}\text{N}$ . Tento případ nenastává, pokud produkt určitého procesu v půdě zůstane. Například v případě imobilizace N do mikrobiální biomasy. Přestože imobilizace může být spojená s diskriminací proti těžkému izotopu  $^{15}\text{N}$ , v izotopovém signálu celkového N v půdě se to neodrazí, protože mikrobiální biomasa zůstává součástí celkového N. V obrázku 4.2.1 jsou uvedeny teoretické hodnoty frakcionačního faktoru, které platí v podmínkách, kdy procesy nejsou limitované nedostatkem substrátu, a vliv ostatních procesů transformace N je zanedbatelný.

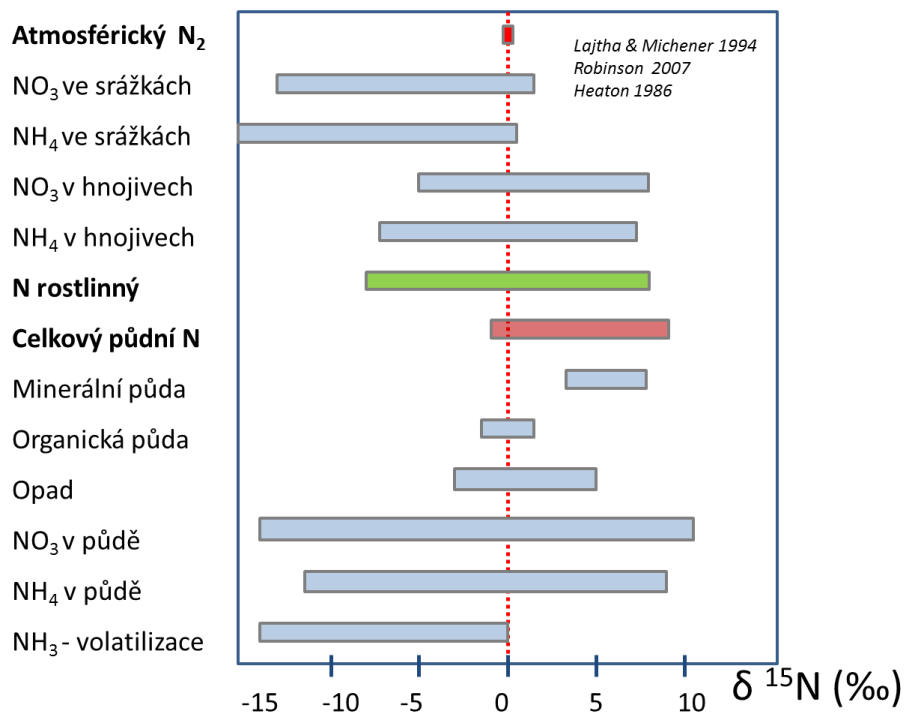
Se zvyšující se limitací substrátem se postupně snižuje frakcionační faktor. V přirozených podmínkách, kde je N často limitujícím prvkem, nelze téměř předpokládat, že frakcionační faktory dosáhnou teoretických hodnot. V předchozích kapitolách už bylo řečeno, že izotopová diskriminace zanechává svou stopu pouze v případě, kdy spotřebovávaný prvek (reaktant, substrát) není limitujícím prvkem. Jinými slovy, pokud si v daném procesu může organismus „vybírat“, zda do reakce vstoupí těžký nebo lehký izotop.



Obr.5.2.1 Teoretické frakcionační faktory spojené s procesy transformace N. Faktory jsou uvedeny v hodnotách  $\Delta$ . To znamená, že udávají obohacení/ochuzení o  $^{15}\text{N}$  vzhledem k substrátu (reaktantu) v ‰. Kladné hodnoty označují ochuzení produktu, záporné obohacení produktu. Hodnoty platí pouze pro podmínky, kdy proces není limitován substrátem.

Dalšími příčinami, proč v přirozeném prostředí nacházíme obrovské odchylky od teoretických hodnot frakcionačních faktorů, je to, (i) že produkt jednoho procesu je současně substrátem pro proces druhý, (ii) že jeden produkt může vznikat z různých substrátů a nakonec i to, (iii) že izotopový signál jednoho substrátu je variabilní v prostoru i čase (Obr. 5.2.2). (i) Představte si dva procesy jdoucí proti sobě - například amonifikaci a nitrifikaci. Produktem amonifikace je amonný iont, který je substrátem pro nitrifikaci. Oba procesy vedou k ochuzení produktu oproti substrátu. Předpokládejme dále, že procesy nejsou limitovány substrátem a frakcionační faktory se blíží teoretické hodnotě. V amonifikaci vznikají amonné ionty ochuzené o  $^{15}\text{N}$  frakcionačním faktorem  $\Delta = 5 \text{ ‰}$ . Amonné ionty dále využívají nitrifikátoři, kteří upřednostňují ionty s lehkým izotopem  $^{14}\text{N}$ . Ionty, které v půdě zbývají, jsou tedy obohaceny o  $^{15}\text{N}$  více, než amonné ionty, které vznikly amonifikací. Pokud bychom počítali  $\Delta$  amonifikace z izotopového signálu amonných iontů zbývajících v půdě, bude  $< 5 \text{ ‰}$ . (ii) Nejčastějším případem využívání dvou různých substrátů pro tvorbu jednoho produktu je imobilizace dusíku mikrobní biomasou. Mikroorganismy mohou využívat organické monomery, amonné i nitrátové ionty. Tyto zdroje mají obvykle různý izotopový signál a jsou využívány v různém poměru v závislosti na jejich koncentraci, složení mikrobiálních společenstev i vnějších podmínkách půdního prostředí. Nelze tedy *a priori* určit, z jakých forem dusíku mikrobní biomasa vznikala. (iii) Komplikujícím faktorem je i to, že izotopový signál jedné formy dusíku se mění v závislosti, z jakého zdroje pochází. Například amonné a

nitrátové formy N mají jiný izotopový signál, pokud vznikly biologickými přeměnami nebo se do půdy dostaly s depozicemi dusíku z atmosféry nebo dusíkatými hnojivy. Kromě toho izotopový signál atmosférických depozic kolísá v závislosti na původu emisí. Všechny uvedené příčiny omezují široké využití přirozeného výskytu stabilního izotopu  $^{15}\text{N}$  pro stopování osudu N v suchozemském ekosystému.



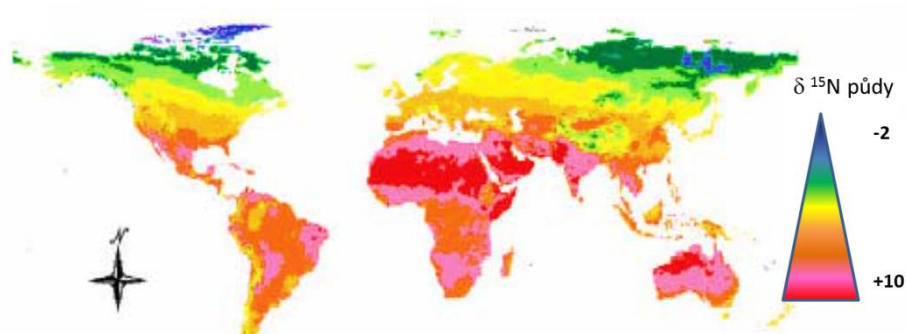
Obr. 5.2.2 Rozsah hodnot izotopového signálu různých forem dusíku.

### 4.3 Posun izotopového signálu $^{15}\text{N}$ v půdě.

Přes všechny uvedené komplikace spojené s využitím stabilního izotopu  $^{15}\text{N}$  pro sledování osudu dusíku v půdách, může posun izotopového signálu půdní organické hmoty nebo vegetace indikovat dlouhodobou převahu jednoho typu procesů nad ostatními nebo dlouhodobý vstup N z určitého zdroje. Tuto situaci můžeme ilustrovat následující případovou studií, kdy Amundson s kolektivem autorů (Amundson *et al.* 2003) měřili izotopový signál půdy ve světových biomech (Obr. 5.3.1). Zjistili, že severské biomy, tundra, jsou ochuzené o  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N} = -2$  až  $-0,6$  ‰) a směrem k jihu se zastoupení  $^{15}\text{N}$  zvyšuje, až dosáhne izotopového signálu  $\delta^{15}\text{N}$  v rozmezí hodnot  $+9$  až  $+10,3$  ‰. Vysoké ochuzení půdní organické hmoty v tundře souvisí s tím, že v tundře je vegetace obvykle limitovaná N a nízkou teplotou. Rostlinný materiál vstupující do půdy je chudý dusíkem, má vysoký poměr C/N, a jeho dekompozice probíhá velice pomalu. V půdě je nedostatek minerálních forem N a tedy i nitrifikace i denitrifikace jsou nízké. Jak víme už z předchozího textu, produkty obou procesů jsou ochuzené o  $^{15}\text{N}$  a z půdy se uvolňují buď vyplavováním ( $\text{NO}_3^-$ ) nebo unikají ve formě oxidů N do atmosféry. Zbylé N látky, které v půdě zůstanou, jsou obohacené. Pokud jsou oba procesy nízké, relativní zastoupení  $^{15}\text{N}$  v půdě nestoupá, protože N z půdy neuniká. Toto je případ severských ekosystémů. Kromě toho je také nízká fixace N, která do půdy přináší relativně obohacený N. Naopak v tropických ekosystémech s rychlou dekompozicí a vysokou



denitrifikací jsou vysoké ztráty plynného N, a celkový N v půdě se postupně obohacuje. K tomu ještě přispívá vysoká fixace atmosférického N s relativně vysokou hodnotou  $\delta^{15}\text{N} = 0 \text{ ‰}$ . Uvedená studie je hezkým příkladem, že v dlouhodobém časovém horizontu se byť i malé posuny v izotopovém signálu sčítají.

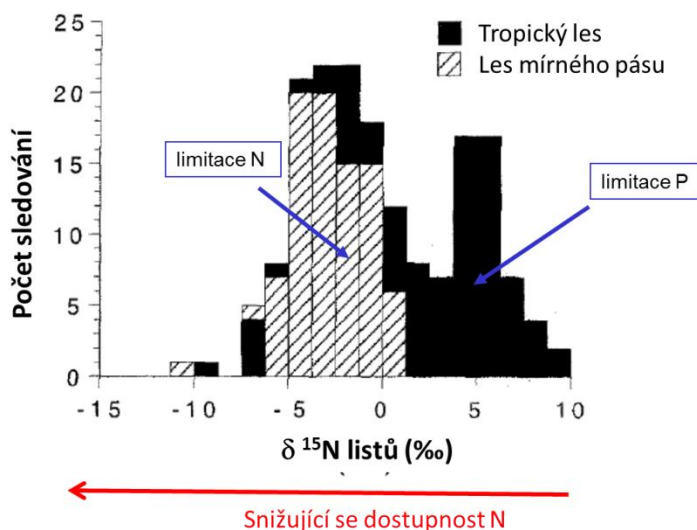


**Malé obohacení v severských ekosystémech**  
**Velké obohacení v tropických ekosystémech**

**Příčiny:** - *velké ztráty plynného silně ochuzeného N v tropech,*  
*významná fixace N*  
 - *malé ztráty plynného N ze severských ekosystémů,*  
*limitace N*

Obr. 5.3.1 Odhad geografického rozdělení izotopového složení  $^{15}\text{N}$  půdy do hloubky 50 cm. Upraveno podle Amunson *et al.* (2003).

Větší dostupnost dusíku v tropických lesích a otevřenější cyklus N náchylný ke ztrátám je potvrzen další studií Martinelliho a kolektivu autorů (Martinelli *et al.* 1999). Studie je založená na předpokladu, že  $\delta^{15}\text{N}$  listů stromů odráží izotopový signál dostupného N v půdě. Analyzovali listy stromů z tropických lesů a lesů mírného pásu (Obr. 5.3.2). Zjistili, že listy stromů z lesů mírného pásu jsou ochuzenější o  $^{15}\text{N}$  (průměrná  $\delta^{15}\text{N} = -2,8 \text{ ‰}$ ) než listy stromů z tropických lesů (průměrná  $\delta^{15}\text{N} = +3,7 \text{ ‰}$ ). Dostupný dusík, který stromy čerpaly z půdy (směs  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  a aminokyselin) byl obohacen. V rámci tropických lesů se vydělila skupina horských tropických lesů a lesů na písčitéch půdách, které jsou limitovány dusíkem. Listy z těchto lesů byly významně ochuzeny oproti údolním tropickým lesům.



Obr. 5.3.2 Histogram znázorňující izotopový signál  $^{15}\text{N}$  listů sebraných v tropických lesích a v lesích mírného pásu. Upraveno podle Martinelli *et al.* (1999).

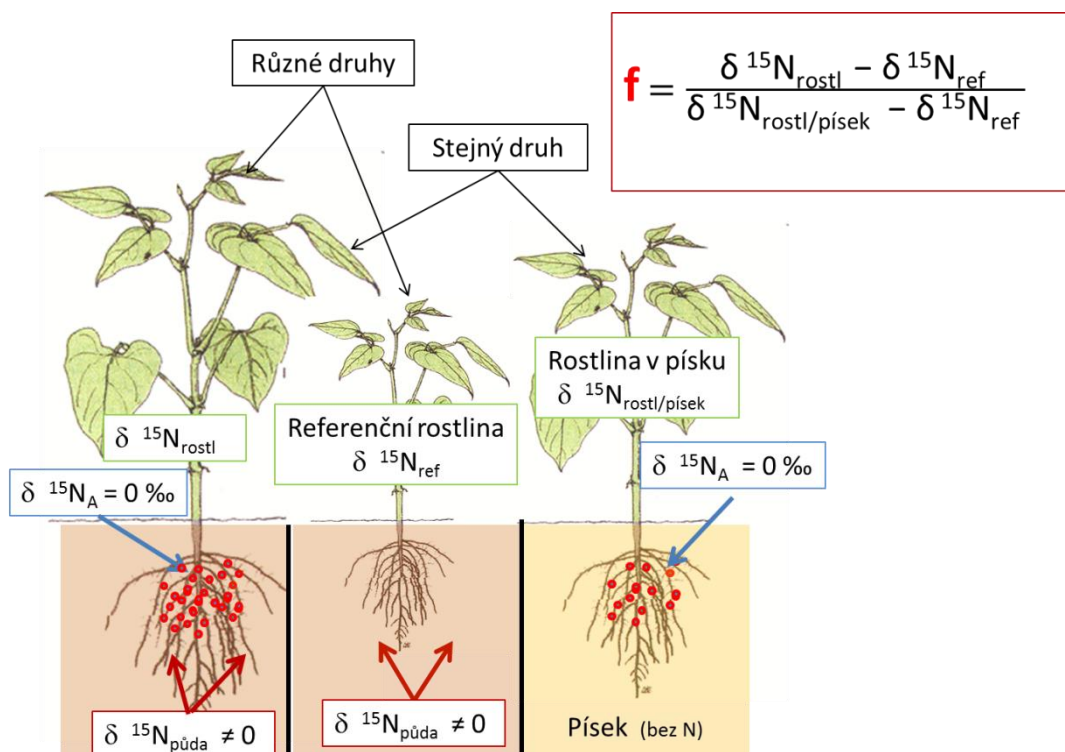
#### 5.4 Odhad fixace $\text{N}_2$

Fixace atmosférického  $\text{N}$  není spojená s diskriminací  $^{15}\text{N}$  a nafixovaný  $\text{N}$  má podobný izotopový signál jako atmosféra, blíží se nule. Teoreticky by rostliny, které jsou závislé pouze na fixaci  $\text{N}_2$ , měly mít izotopový signál blízký nule. Rostliny, které jsou závislé na dostupném  $\text{N}$  z půdy, by měly být relativně obohaceny, protože denitrifikací se z půdy uvolňuje ochuzený  $\text{N}$  a v půdě zůstává  $\text{N}$  obohacený o  $^{15}\text{N}$ . Dalším zdrojem obohacení půdy může být aplikace minerálních hnojiv. Pokud rostliny fixující  $\text{N}_2$  přijímají kromě atmosférického  $\text{N}$  ještě půdní  $\text{N}$ , jejich izotopový signál  $\delta^{15}\text{N}$  by měl být odlišný od  $\delta^{15}\text{N}$  rostlin, které využívají výhradně půdní  $\text{N}$ , v závislosti na tom, jak velký podíl přijatého  $\text{N}$  je z fixace a jaký z půdních zdrojů. Analýzy rostlin z přirozených podmínek však ukazují, že  $\delta^{15}\text{N}$  rostlin prokazatelně fixujících  $\text{N}_2$  je variabilní a často shodná s rostlinami, které  $\text{N}$  nefixují. Na druhou stranu, rostliny prokazatelně nefixující  $\text{N}_2$  mohou mít  $\delta^{15}\text{N}$  blízký nule. Dalším úskalím v použití přirozeného výskytu  $\delta^{15}\text{N}$  pro určení fixace  $\text{N}$  rostlinami je to, že i rostliny, které jsou zcela závislé na půdním  $\text{N}$ , mají variabilní  $\delta^{15}\text{N}$  a je složité stanovit referenční hodnotu  $\delta^{15}\text{N}$ , která odpovídá  $\delta^{15}\text{N}$  dostupného  $\text{N}$  v půdě. Použití metod přirozeného výskytu  $^{15}\text{N}$  pro kvantifikaci fixace  $\text{N}_2$  v přirozených podmínkách proto často dává rozporuplné výsledky. Jediným způsobem, jak se pokusit zredukovat výše uvedené zdroje variability, je odběr co největšího počtu druhů v blízkém okolí druhu, jehož fixaci  $\text{N}_2$  chceme kvantifikovat (Boddey *et al.* 2000).

Přirozeného výskytu  $^{15}\text{N}$  se s větším úspěchem využívá pro kvantifikaci fixace  $\text{N}_2$  rostlinami v laboratorních podmínkách (Obr. 5.4.1). V tomto případě rostlinu, u které chceme kvantifikovat jaký podíl  $\text{N}$  v biomase pochází z fixace  $\text{N}_2$  a jaký z půdních zdrojů, pěstujeme v půdě, ve které známe  $\delta^{15}\text{N}$  dostupného  $\text{N}$ , a v písku bez dusíku. Jako referenční rostlinu vybereme rostlinu, která nefixuje  $\text{N}_2$ , ale je svým habitatem, kořenovou architekturou a fenologickou fází podobná rostlině, u které podíl fixace  $\text{N}_2$  sledujeme. Tuto referenční rostlinu pěstujeme ve stejné půdě jako zájmovou rostlinu. Na konci pokusu, nebo během pokusu, v závislosti na tom, zda chceme znát celkovou

fixaci nebo její vývoj v čase, změříme izotopový signál biomasy zájmové rostliny závislé pouze na fixaci atmosférického N<sub>2</sub> ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{rostl/písek}}$ ), zájmové rostliny rostoucí v půdě (kombinace půdního a atmosférického N<sub>2</sub>;  $\delta^{15}\text{N}_{\text{rostl}}$ ) a referenční rostliny (pouze půdní N;  $\delta^{15}\text{N}_{\text{ref}}$ ) a vypočítáme podíl fixovaného N<sub>2</sub> podle následujícího vzorce:

$$f = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{rostl}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{ref}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{rostl/písek}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{ref}}}$$



Obr. 5.4.1 Schématické znázornění uspořádání pokusu při kvantifikaci fixace N<sub>2</sub> rostlinou rostoucí v půdě.

Pro to, abychom dostali použitelné výsledky, je třeba, aby rozdíl mezi izotopovým signálem  $\delta^{15}\text{N}$  půdy a atmosféry byl větší než 2 ‰. Referenční rostlina musí být svým kořenovým systémem blízko kořenového systému zájmové rostliny, ale nesmí do něj zasahovat. Při výběru referenční rostliny nejraději volíme dvouděložnou rostlinu co nejpodobnější zájmové rostlině. Kromě izotopů doporučujeme měřit i výskyt hlízek, fixátorů N<sub>2</sub>, fixaci N<sub>2</sub> pomocí metody redukce acetylenu eventuálně celkový příjem dusíku (Pate 1993, Unkovich *et al.* 2001, Unkovich a Pate 2001).

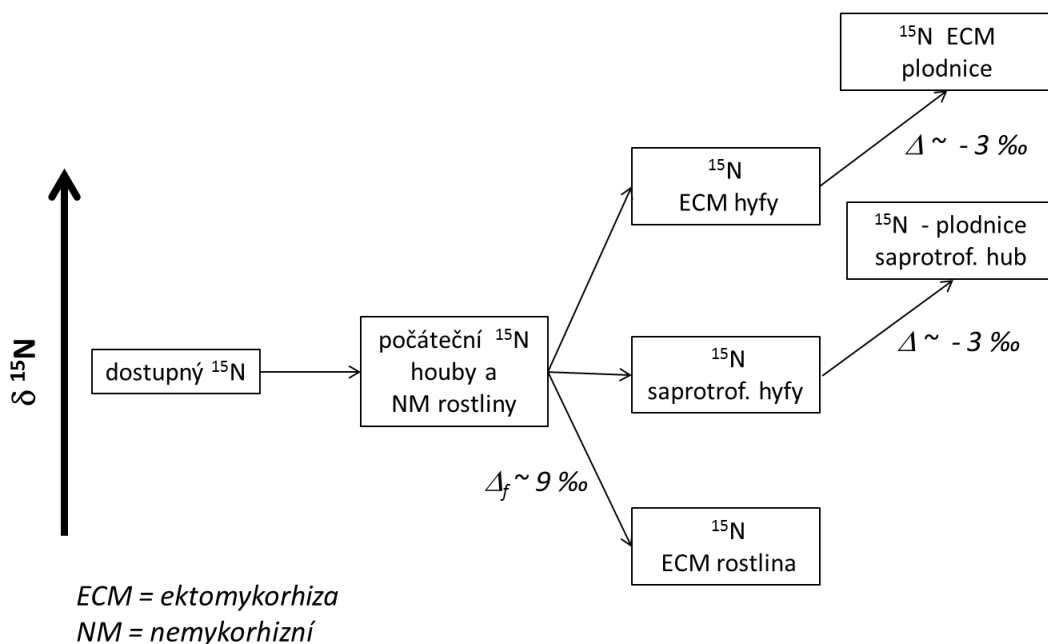
### 5.5. Příspěvek mykorhizních hub k výživě N rostlin

V půdě žijí dvě skupiny hub. Saprotrofní houby, které přijímají uhlík z rozkládající se mrtvé organické hmoty a mykorhizní houby, které vytvářejí symbiotické interakce s rostlinami. Rostlina, která žije v interakci s mykorhizní houbou, je schopná úspěšně soutěžit s volně žijícími mikroorganismy o živiny v půdě, především o P a N. Mykorhizní houba naopak od rostliny získává velký podíl dostupných uhlíkatých látek z čistě

primární produkce. Uvádí se, že rostliny alokují až 20 % čisté primární produkce do mykorhiz. Studium a pochopení interakcí mezi rostlinou a mykorhizní houbou je vždy složité protože se tyto interakce odehrávají schované v půdní matrix a přímá sledování v přirozeném ekosystému nejsou možná. Měření přirozeného výskytu stabilního izotopu  $^{15}\text{N}$  se zdá být vhodnou metodou pro studium těchto mykorhizních interakcí, pro odhad toho, jaké formy N rostlina přijímá i pro kvantifikaci podílu rostlinného N, který rostlina získala prostřednictvím mykorhizních hub. Analýza  $\delta^{15}\text{N}$  v půdě, listech a plodnicích umožňuje odhad množství N, které rostlina přijímá od houby.

Mykorhizní asociace se obvykle dělí do několika morfologicky, taxonomicky a funkčně rozdílných typů, z nichž nejpočetnější a nejdůležitější typy jsou ektomykorhizní (ECM), erikoidní (ERM) a arbuskulární mykorhizy (AM). Obecně platí trend, že ECM a ERM rostliny jsou ochuzené o  $^{15}\text{N}$  více (mají nižší  $\delta^{15}\text{N}$ ) než AM rostliny a rostliny bez rozvinutých mykorhiz. AM rostliny mívají nižší  $\delta^{15}\text{N}$  než rostliny bez mykorhiz. Variabilita v rámci jedné skupiny je ale velká a často dochází k překryvu izotopového signálu  $\delta^{15}\text{N}$  mezi jednotlivými skupinami. Tyto výsledky ukazují že, (i) mykorhizní houba posílá do rostliny dusíkaté látky ochuzené o  $^{15}\text{N}$  a v myceliu si ponechává obohacené látky, (ii) diskriminace spojená s ECM a ERM je pravděpodobně větší než diskriminace spojená s AM, (iii) míra frakcionace závisí na množství (podílu) N látek v rostlinné biomase, které rostlina přijala od houby a že (iv) dostupný N, který rostliny přijímají z půdy, se liší izotopovým signálem v závislosti na zdroji N a lokalizaci kořenů v půdě.

Dusíkaté látky v houbovém vláknu jsou z 90 % tvořeny proteiny a aminokyselinami a z 10 % chitinem. Proteiny jsou v porovnání s chitinem obohaceny o 9 ‰. Je známo, že houba přenáší N do rostliny především ve formě aminokyselin, Zdá se tedy nelogické, proč je mykorhizní rostlina, která přijímá od houby aminokyseliny, ochuzená o  $^{15}\text{N}$  v porovnání s myceliem. Je to tím, že houba diskriminuje proti  $^{15}\text{N}$  při tvorbě aminokyselin, které následně přenáší do rostliny a přenos ochuzených aminokyselin je provázen zadržením obohacených aminokyselin v houbových vláknech (Högberg 1997). Mycelia saprotrofních hub, které nepřenášejí N látky do rostlin, mají podobný izotopový signál jako zdroj N v půdě. Podobně N rostlin bez mykorhizních asociací má podobný izotopový signál jako dostupný N v půdě. Toho se využívá k tomu, že pro odhad příjmu N prostřednictvím mykorhiz se může použít nemykorhizní rostlina, jako integrované měřítko  $\delta^{15}\text{N}$  dostupného N v půdě. Je ale dobré mít na paměti, že nemykorhizní rostlina může být adaptována na odlišné N podmínky a může přijímat jiné formy N z jiných částí půdního profilu. Plodnice hub mykorhizních i saprotrofních jsou obohaceny o cca 3 ‰ v porovnání s myceliem, což je možné vysvětlit tím, že houby posílají do plodnic preferenčně látky vytvořené z proteinů a v myceliu uchovávají ochuzený chitin (Obr. 5.5.1)



Obr. 5.5.1 Diagram rozdělení  $^{15}\text{N}$  mezi dostupný N, rostliny a houby. Houby jsou rozděleny na hyfy a plodnice. ECM hyfy a plodnice obou skupin hub jsou obohacené, ECM rostliny jsou ochuzené. Upraveno podle Hobbie *et al.* (2005).

Interní recyklace N v rostlině je obvykle spojena s malou diskriminací a izotopový signál  $\delta^{15}\text{N}$  listů nebo jehlic reprezentuje izotopový signál rostliny a N, který rostlina přijala. Mykorhizní houby ovlivňují izotopový signál a míra ovlivnění závisí na tom, kolik N rostlina od houby odebrala. Závisí tedy na podílu rostlinného N, který rostlina získala od mykorhizní houby ( $f$ ) ale také na tom, kolik z přijatého N houba přesunula do rostliny (transferový poměr,  $T_r$ ) a jaký je frakcionační faktor ( $\Delta$ ). Hobbie *et al.* (2000) navrhli teoretický model výpočtu pro rozdělení N mezi rostlinou a houbou. Tento výpočet předpokládá, že při příjmu N z půdy nedochází k diskriminaci  $^{15}\text{N}$  a že rostlina i houba jsou izotopově homogenní:

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{rost}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{dostupný N}} - \Delta_f \cdot f \cdot (1 - T_r), \quad 5.5.1.1$$

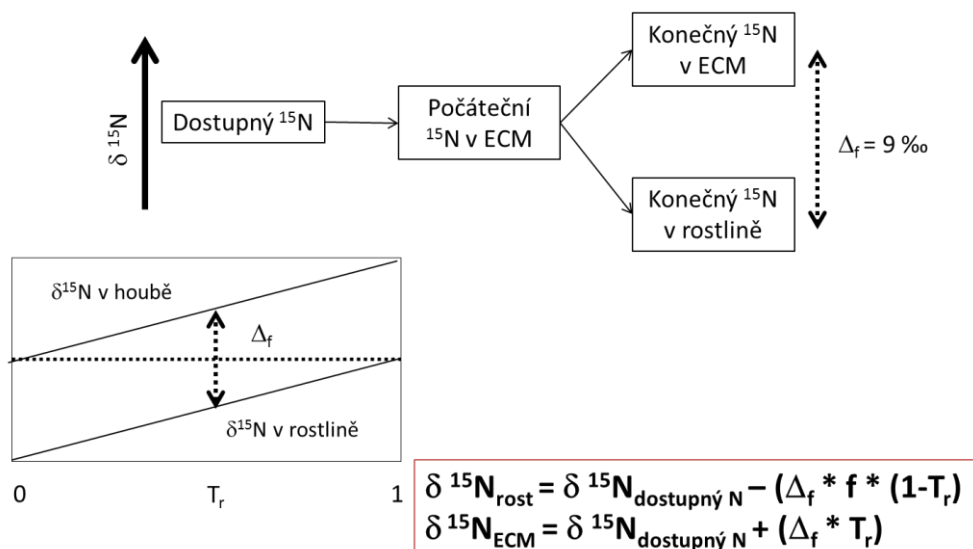
Pokud rostlina přijímá N pouze od houby ( $f = 1$ ), pak se závislost zjednoduší na

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{rost}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{dostupný N}} - \Delta_f \cdot (1 - T_r) \quad 5.5.1.2$$

A rovnice pro mykorhizní houbu je:

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{ECM}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{dostupný N}} + (\Delta_f \cdot T_r) \quad 5.5.1.3$$

Aplikace tohoto modelu pro studie *in situ* je obtížná vzhledem k tomu, že (i) je nesnadné stanovit  $\delta^{15}\text{N}$  jednotlivých forem dostupného N v půdě, (ii) nelze přímo určit  $f$  a  $T_r$ , ale pouze složenou veličinu  $f \times (1 - T_r)$ , (iii) rostlina a ECM mohou využívat jiné zdroje dostupného N a v jiném poměru a nakonec (iv) naměřit izotopový signál ECM mycelia je obtížné (infikované kořenové špičky by mohly být brány jako  $\sim \delta^{15}\text{N}_{\text{ECM}}$ ). Je například prokázáno, že druhy hub s vysokou proteolytickou aktivitou mají mycelium obohacnější než houby s nízkou proteolytickou aktivitou.



ECM = ektomykorhiza

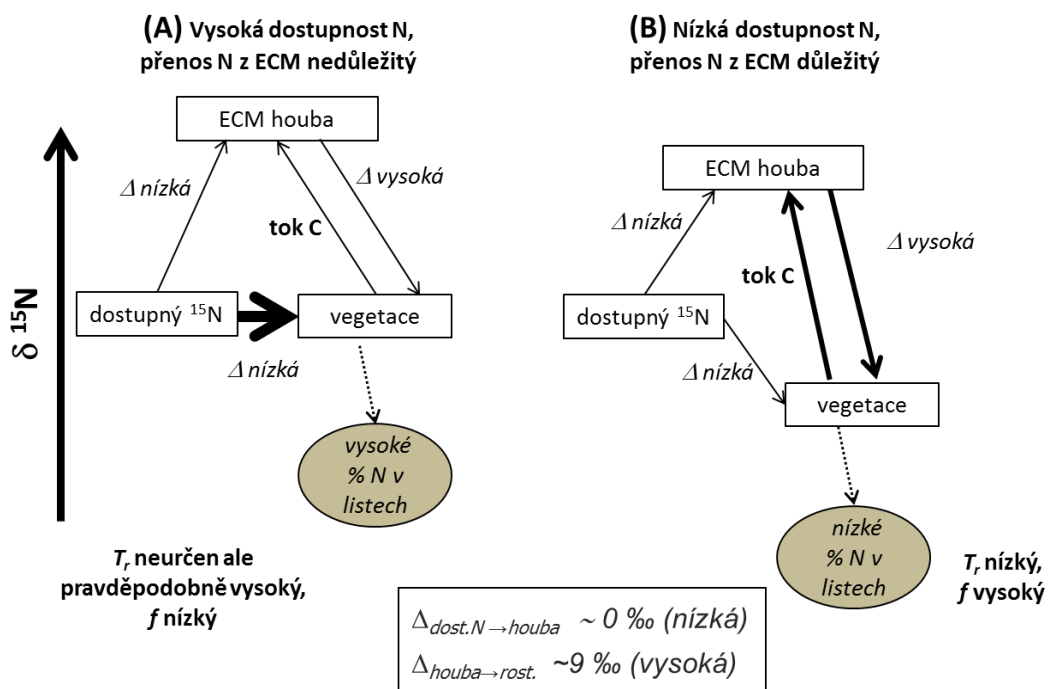
$\Delta_f$  = mykorhizní frakcionace spojená s transportem N do rostliny

$f$  = podíl rostlinného N, který rostlina získala od mykorhizní houby.

$T_r$  = N využitý houbou/N transportovaný do rostliny (mycorrhizal transfer ratio)

Obr. 5.5.2 Hypotetický model pohybu N od dostupných forem N před mykorhizní houbu do rostliny a související izotopová frakcionace. Model používá obecné vztahy definované pro otevřený systém s proměnlivým transferovým poměrem konečného produktu. Upraveno podle Hobbie *et al.* (2000).

V mnoha studiích, které porovnávají rostliny rostoucí na různých stanovištích, byla stanovena průkazná závislost mezi obsahem N (% N) a  $\delta^{15}\text{N}$  v listech. Kromě toho bylo prokázáno, že se zvyšující se limitací N v půdě se snižuje  $\delta^{15}\text{N}$  v listech a současně se zvyšuje tok C z rostliny do mykorhizní houby. To naznačuje, že v podmínkách limitace N (i)  $\delta^{15}\text{N}$  v listech je určován ECM, (ii) rostlina zvyšuje relativní alokaci C do půdy a (iii)  $\delta^{15}\text{N}$  v listech se snižuje se zvyšující se limitací N. Různý podíl hub na příjmu N rostlinami a různá alokace C do půdy se projeví změnou v  $T_r$ ,  $f$  nebo v obou veličinách (Obr. 5.5.3). V prostředí s vysokou dostupností N rostlina alokuje méně C do podzemních částí, má vyšší % N v listech a veličina  $f \cdot (1-T_r)$  se snižuje. V důsledku toho je  $\delta^{15}\text{N}$  v listech více pozitivní než v N limitovaných podmínkách. Kromě toho ECM neposkytuje rostlině N a využije ho pro vlastní potřebu. Podíl přijatého N, který ECM přesunula do rostliny,  $T_r$ , je proto vysoký a ECM má v půdách bohatých na N vyšší  $\delta^{15}\text{N}$  než ECM v půdách limitovaných N (Obr. 5.5.3 a). V prostředí s nízkým obsahem N je % N v listech nízké, rostlina alokuje hodně C do podzemních částí a veličina  $f \cdot (1-T_r)$  se zvyšuje. Protože většina N proudí přes ECM, snižuje se  $\delta^{15}\text{N}$  v listech (Obr. 5.5.3 b).



Obr. 5.5.3 Pravděpodobné interakce mezi dostupností N, tokem C do podzemních částí, rozdělováním N a posunem  $\delta^{15}\text{N}$  v systému rostlina – ECM. Upraveno podle Hobbie *et al.* (2000).

Na základě předchozích předpokladů můžeme upravit rovnice (5.5.1.1) až (5.5.1.3), které kvantifikují rozdělování N mezi ECM a hostitelskou rostlinou:

$$T_r = (1 + \delta^{15}\text{N}_{\text{rost}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{dostupného N}}) / \Delta \quad 5.5.1.4$$

Výše vysvětlené modely dobře popisují získané výsledky, ale pro lepší porozumění problematiky a přesnější kvantifikaci množství N spotřebovaného rostlinou prostřednictvím mykorhizních symbióz je potřeba mít informace i o izotopovém složení dostupných forem N v půdě a o růstu rostliny. Rychlý rozvoj analytických metod ale slibuje, že tento problém by mohl být poměrně rychle překonán. V jakémkoliv ekosystému můžeme z posunu izotopového signálu v mykorhizních houbách a rostlinách odhadnout i bez znalosti izotopového signálu dostupných forem N, zda rostlina využívá N přijatý prostřednictvím mykorhizní houby nebo jestli mykorhizní houba přesouvá N do rostliny.

#### 4.6 Seznam použité literatury

- AMUNDSON R., AUSTIN A.T., SCHUUR E.A. G., YOO K., MATZEK V., KENDALL C., UEBERSAX A., BRENNER D., BAIDEN W.T. (2003) Global patterns of the isotopic composition of soil and plant nitrogen. *Global Biogeochemical Cycles*. **17**, 1-10.
- BODDEY R.M., PEOPLES M.B., PALMER B., DART P.J. (2000) Use of the  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **57**, 235-270.
- HEATON T.H.E. (1986) Isotopic studies of nitrogen pollution in the hydrosphere and atmosphere – a review. *Chemical Geology*, **59**, 87-102.
- HOBBIE E.A., JUMPPONEN A., TRAPPE J. (2005) Foliar and fungal  $^{15}\text{N}$ : $^{14}\text{N}$  ratios reflect development of mycorrhizae and nitrogen supply during primary succession: testing analytical models. *Oecologia* **146**, 258-268.
- HOBBIE E.A., MACKO S.A., WILLIAMS M. (2000) Correlations between foliar  $\delta^{15}\text{N}$  and nitrogen concentrations may indicate plant-mycorrhizal interactions. *Oecologia* **122**, 273-283.
- HÖGBERG P. (1997)  $^{15}\text{N}$  natural abundance in soil- plant systems. *New. Phytol.* **137**, 179-203.
- LAJTHA K., MICHENER R.H. (1994) Stable isotopes in ecology and environmental science. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- MARTINELLI L.A., PICCOLO M.C., TOWNSEND A.R., VITOUSEK P.M., CUEVA E., MCDOWELL W., ROBERTSON G.P., SANTOS O.C., TRESENDER K. (1999) Nitrogen stable isotopic composition of leaves and soil: Tropical versus temperate forests. *Biogeochemistry* **46**, 45-65.
- PATE J.S. (1993) Structural and functional responses to fire and nutrient stress: case studies from the sandplains of South-West Australia. In: *Plant Adaptation to Environmental Stress*. Fowden L., Mansfield T.A., Stoddart J.L. (ed.) Pp. 189-205, Chapman and Hall, London.
- ROBINSON D. (2001)  $\delta^{15}\text{N}$  as an indicator of the nitrogen cycle. *Trends in ecology & evolution* **16**, 153-162.
- UNKOVICH M., PATE J., MCNEIL A., GIBBS D.J. (2001) Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems. (Series: *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, Vol. 40) Kluwer-Academic Publisher, The Netherlands, p.291.
- UNKOVICH M., PATE J.S. (2001) Assessing  $\text{N}_2$  fixation in annual legumes using  $^{15}\text{N}$  natural abundance. In: *Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems*. Unkovich M.J., Pate J.S., McNeill A., Gibbs J. (ed.) (Series: *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, Vol. 40) Kluwer-Academic Publisher, The Netherlands.



## 6 IZOTOPOVÁ ZŘEĎOVACÍ METODA (*POOL DILUTION TECHNIQUE*)

**Karolina Tahovská**

Izotopová zřeďovací metoda se používá **k určení rychlosti transformace živin v půdě**. Principem metody je, že se do prostředí přidá izotopově značený produkt sledovaného procesu a měří se ředění jeho izotopového signálu v čase. Výhodou je, že se neovlivní rychlost reakce zvýšením koncentrace substrátu. Autoři Kirkham a Bartholomew (1954, 1955) jako první použili zřeďovací metodu pro stanovení rychlosti amonifikace (přeměna organických forem N na  $\text{NH}_4^+$ ) a formulovali výpočty pro odhad její rychlosti v půdě. Autoři přidali do půdy amonné ionty, v nichž byl veškerý dusík nahrazen izotopem  $^{15}\text{N}$  ( $^{15}\text{NH}_4$ ) a v čase sledovali ředění výskytu těžkého izotopu  $^{15}\text{N}$ . Protože ředění izotopového signálu  $^{15}\text{N-NH}_4$  je způsobeno tím, že se do půdy uvolňují amonné ionty obsahující více než 99,63 % lehkého izotopu  $^{14}\text{N}$ , mohli vypočítat rychlost uvolňování  $\text{NH}_4^+$  při mineralizaci půdní organické hmoty. Právě proto, že počátky metody jsou spjaté s přeměnami dusíku v půdě, nacházíme ve vědecké literatuře z pozdějších let nejvíce aplikací zřeďovací metody pro  $^{15}\text{N}$  (souhrn Murphy *et al.* 2003). Stejně tak i následující text je zaměřen na použití zřeďovací metody pro stanovení rychlosti přeměn N v půdě. Tato technika však může být použita i při studiu přeměn dalších prvků, jakými jsou např. fosfor a síra (souhrn Di *et al.* 2000).

### 6.1 Hrubé a čisté toky procesů přeměny N v půdě

Mineralizací organické hmoty se obvykle rozumí uvolnění  $\text{NH}_4^+$  do půdního roztoku činností mikroorganismů, **hrubá (gross) amonifikace**. Vzniklý amonný iont může být buď oxidován mikroorganismy v procesu nitrifikace na dusičnan (**hrubá nitrifikace**, vznik  $\text{NO}_3^-$ ), nebo jej mohou mikroorganismy (popřípadě rostliny) přijmout do biomasy (**asimilace  $\text{NH}_4^+$** ). V menší míře je mikroorganismy (a rostlinami) přijímán i dusičnan (**asimilace  $\text{NO}_3^-$** ). Procesy mineralizace (amonifikace a nitrifikace) a asimilace je dusík neustále přetvářen z organické do anorganické formy a zpět a současně z jedné anorganické formy na druhou (viz kapitola 5.1.).

---

*V literatuře se používá pojem mineralizace N v různém významu: (1) jako synonymum pro amonifikaci a (2) jako sumární výraz pro amonifikaci a nitrifikaci. Zřeďovací metodu lze použít pouze pro měření amonifikace a nitrifikace odděleně, nelze ji použít pro měření obou procesů dohromady. V našem příspěvku budeme používat termíny amonifikace a nitrifikace. Pokud použijeme termín mineralizace, myslíme tím změnu v obsahu obou iontů,  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$*

---

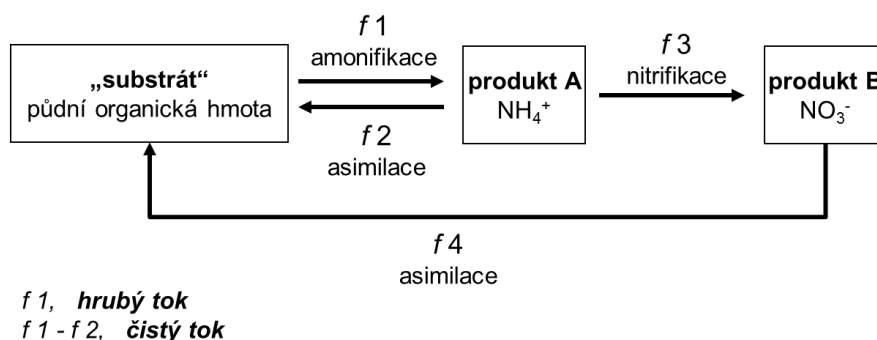
Celková změna v zásobě dostupného anorganického N v půdě ( $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$ ; **čistá (net) mineralizace**) je tedy výsledkem vzájemně se ovlivňujících procesů hrubé amonifikace, nitrifikace a  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  asimilace (Obr. 6.1.1)<sup>15</sup>, ale také imobilizace na půdní matrix,

---

<sup>15</sup>To, zda v půdním systému převládá čistá mineralizace nebo asimilace dusíku, je úzce spjato s dostupností organického substrátu (uhlíku) a souvisí s C:N poměrem půdní organické hmoty (van Veen a kol. 1984). Bylo také prokázáno, že schopnost ekosystémů zadržovat dusík do jisté míry závisí na C:N

volatilizace  $\text{NH}_3$  a vyplavování  $\text{NO}_3^-$ . Čistá amonifikace je výsledkem rozdílu mezi tvorbou  $\text{NH}_4^+$  s jeho spotřebou v procesech nitrifikace a asimilace. Obdobně čistá nitrifikace je výsledkem rozdílu mezi tvorbou  $\text{NO}_3^-$  a jeho spotřebou v procesech denitrifikace, disimilativní redukce a asimilace.

Zatímco čisté toky N můžeme stanovit změřením změny koncentrací forem N v čase, **k určení hrubých toků N je zapotřebí použít metodu izotopového značení.**



Obr. 6.1.1 Zjednodušené znázornění čistých a hrubých toků procesů přeměny N v půdě.

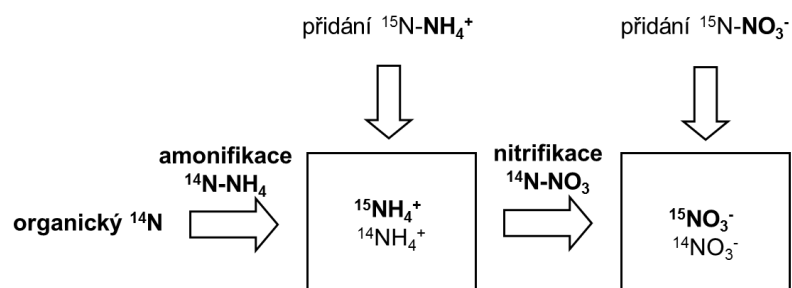
## 6.2 Princip $^{15}\text{N}$ zřed'ovací metody

Do prostředí přidáváme značený výsledný produkt reakce a měříme rychlost jeho zřed'ování. V případě amonifikace přidáváme  $^{15}\text{N-NH}_4$  a v případě nitrifikace  $^{14}\text{N-NO}_3$ . Když přidáme do půdního vzorku těžký izotop ( $^{15}\text{N-NH}_4$  nebo  $^{15}\text{N-NO}_3$ ), označíme celkový zásobník  $\text{NH}_4$  ( $\text{NO}_3$ ) a v půdě je směs lehkého a těžkého izotopu  $^{14}\text{N}^{15}\text{N-NH}_4$ , ( $^{14}\text{N}^{15}\text{N-NO}_3$ ). Po krátké době, v rozsahu hodin až několika dnů, zjistíme, že těžkého izotopu v zásobníku ubývá (klesá poměrné zastoupení  $^{15}\text{N}$  měřené at% nebo  $\delta^{15}\text{N}$  čili „izotopový signál“). Je to způsobeno tím, že do obohaceného zásobníku „přitéká“ amonifikací (nitrifikací)  $^{14}\text{N-NH}_4$  ( $^{14}\text{N-NO}_3$ ) a tím dochází k poklesu at%  $^{15}\text{N}$  (zřed'ování poměrného obsahu  $^{15}\text{N}$ ; Obr. 6.2.1). **Značíme tedy vždy produkt daného procesu přeměny N a jeho změnu koncentrace a obohacení měříme v čase.**

V půdním prostředí ale nikdy nenastane situace, že by ze sledovaného zásobníku neubývaly  $\text{NH}_4$  ( $\text{NO}_3$ ) ionty. Jsou spotřebovávány v dalších procesech (Obr. 6.2.2). Při spotřebě sice klesá celková velikost zásobníku, ale nemění se jeho izotopový signál. Přesněji řečeno diskriminace spojená s jednotlivými procesy je v prostředí obohaceném o několik % zanedbatelná. Protože jediným zdrojem změny izotopového signálu je produkovaný  $\text{NH}_4$  ( $\text{NO}_3$ ), může být produkce oddělena od spotřeby a můžeme měřit hrubou amonifikaci (nitrifikaci).

---

poměru organické vrstvy půdy (Gundersen et al. 1998; Dise et al. 1998). Čím vyšší je tento poměr, tím je riziko vyplavování anorganického dusíku menší.



Obr. 6.2.1 <sup>15</sup>N

**Rychlost hrubé amonifikace ( $m$ ) a spotřeby  $\text{NH}_4^+$  ( $a$ )** je pak možné vypočítat podle následujících vztahů (Kirkham a Bartholomew, 1954):

$$m = [(M_0 - M_t)/t] \cdot [(\log H_0 M_t / H_t M_0) / (\log M_0 M_t)] \quad 6.2.1$$

$$a = [(M_0 - M_t)/t] \cdot [(\log H_0 / H_t) / (\log M_0 / M_t)] \quad 6.2.2$$

kde:

$m$	je rychlost hrubé amonifikace	( $\mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ )
$a$	je rychlost hrubé spotřeby	( $\mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ )
$M_0$	je $^{14}\text{NH}_4^+ + ^{15}\text{NH}_4^+$ na počátku (čas $t_0$ )	( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
$M_t$	je $^{14}\text{NH}_4^+ + ^{15}\text{NH}_4^+$ na konci měření (čas $t$ )	( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
$H_0$	je $^{15}\text{NH}_4^+$ na počátku (čas 0)	( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
$H_t$	je $^{15}\text{NH}_4^+$ na konci měření (čas $t$ )	( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
$t$	je $t - t_0$	(dny)
$\log$	je při základu 10 nebo 2,718 pro $a \neq m$ ; při základu e pro $a = m$ (viz níže)	

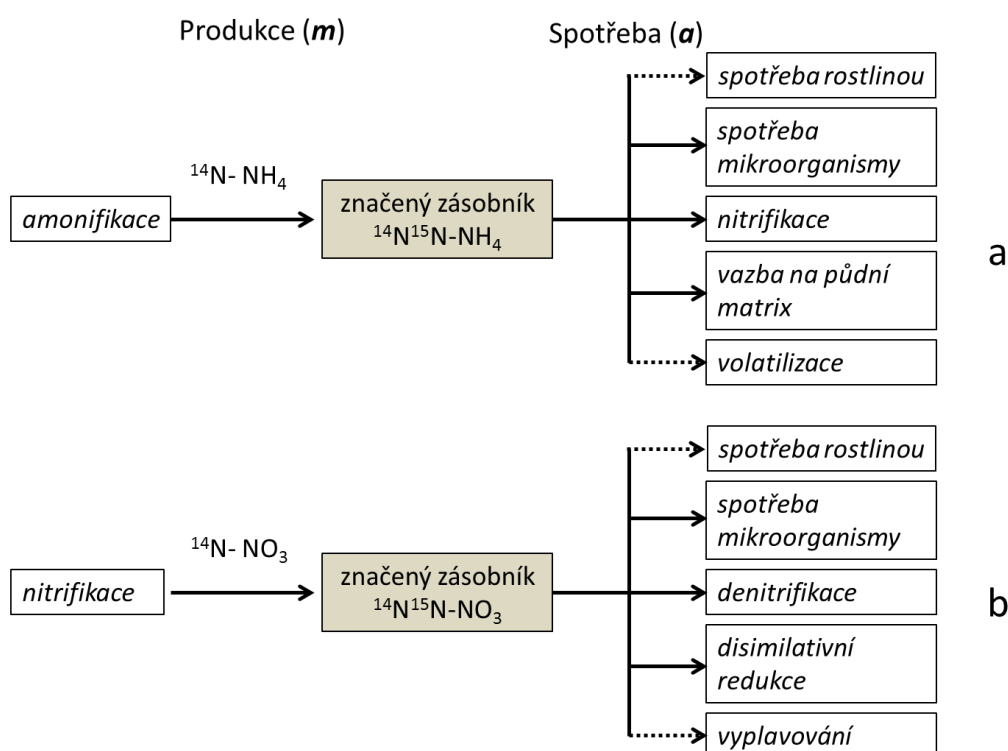
Podobně lze vypočítat **rychlost hrubé nitrifikace a spotřeby  $\text{NO}_3^-$**  v případě, že byl přidáván  $^{15}\text{NO}_3^-$  a to dosazením hodnot pro  $\text{NO}_3^-$  místo hodnot pro  $\text{NH}_4^+$ .

Pro podmínky v nichž  $a \neq m$  budou všechny členy rovnic (6.2.1) a (6.2.2) nabývat pozitivních hodnot. V případě, že se  $a = m$  můžeme použít následující variantu výpočtu (Kirkham a Bartholomew, 1954):

$$m = a = (M_0/t) \cdot \log H_0/H_t$$

6.2.3

Před vlastním stanovením mineralizace a asimilace N je dobré se zamyslet nad tím, které z procesů přeměny N mohou být v námi zkoumaném půdním systému převažující a stanovit, jak velké jsou zásoby jednotlivých iontů. Jak podotýká Schimel (1996), zředovací metodou měříme v podstatě **produkci a spotřebu iontů  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$** . Obohacení půdy o  $^{15}\text{NH}_4$  tedy umožní změření hrubé amonifikace a **celkové spotřeby  $\text{NH}_4^+$** , která může zahrnovat jeho asimilaci mikroorganismy,  $\text{NH}_4^+$  oxidaci (nitrifikaci), volatilizaci a v terénních podmínkách i odběr rostlinami (Obr. 6.2.2a). Obohacením půdy o  $^{15}\text{NO}_3^-$  stanovíme hrubou nitrifikaci (autotrofní + heterotrofní) a **celkovou spotřebu  $\text{NO}_3^-$**  zahrnující mikrobiální asimilaci, denitrifikaci, disimilativní redukci dusičnanu na amoniak a případně také odběr rostlinami (Obr. 6.2.2b).



Obr. 6.2.2 Konceptní model zředovací metody ukazující toky přes zásobu (a)  $\text{NH}_4^+$  a (b)  $\text{NO}_3^-$  iontů v půdním systému. Plné šipky ukazují procesy, které probíhají jak v laboratorních, tak i v terénních podmínkách. Tečkované šipky ukazují procesy probíhající v terénu a za přítomnosti živých rostlin (podle Di *et al.* 2000).

### 6.3 Zředovací $^{15}\text{N}$ metoda v praxi

Správné použití zředovací metody (docílení co největší přesnosti) vyžaduje dodržení určitých podmínek během měření. V principu předpokládáme, že během mikrobiálních procesů přeměny dusíku **nebude docházet k diskriminaci mezi  $^{14}\text{N}$  a  $^{15}\text{N}$** . Jak bylo výše zmíněno, o tomto předpokladu při značených pokusech není třeba pochybovat, protože diskriminace v rozsahu několika ‰ nemůže ovlivnit výsledky pokusu, kde jsme provedli značení řádově v %. Inkubační interval, jinými slovy doba, po kterou vzorek sledujeme, by neměl být příliš dlouhý. Zároveň je třeba zajistit, aby došlo k ustálení rovnováhy mezi původní zásobou dusíku v půdě a dusíkem přidaným. Doporučený průměrný **inkubační interval je 24 hodin** od přidání značky (Davidson *et al.* 1991; Murphy *et al.* 1997, 1999). Pro půdy s nižším obsahem jílu může být interval i kratší. Zároveň by výskyt izotopu  $^{15}\text{N}$  v obohaceném produktu měl být několikanásobný oproti přirozenému výskytu. Chyba měření také klesá tím víc, čím větší je zředění během inkubace.

Dále předpokládáme, že všechny procesy, které nastanou během inkubace (např. difúze, volatilizace, fixace N apod.) stejnoměrně ovlivní původní i přidávaný N. Obecně je tedy vhodné přidávat pouze malé množství N s vyšším značením a zajistit jeho rovnoměrnou distribuci ve vzorku (**vrstva půdy do 2cm**). Obvyklý přírůstek  $^{15}\text{N}$  se **pohybuje, od 5 do 25 % velikosti zásoby  $\text{NH}_4^+$**  (resp.  $\text{NO}_3^-$ , Wessel and Tietema, 1992).

$^{15}\text{N}$  se nejčastěji přidává **ve formě roztoku soli rozkapáním do půdního vzorku**. Můžeme použít speciální pipetu přizpůsobenou k jednorázovému a několikanásobnému vstříkávání nebo jednodušeji roztok rozkapeme obyčejnou pipetou po povrchu a vzorek promícháme. Krátkou **před-inkubační vzorku** (obvykle přibližně několik hodin až den), která předchází vlastnímu značení, se můžeme vyhnout vlivu narušení vzorku jeho přípravou. Během před-inkubace je také možné velmi suchou půdu pozvolna ovlhčit a zamezit tak skokovému zvýšení mineralizace půdní organické hmoty jako reakce na přírůstek značícího roztoku a tím i nadhodnocení mineralizace N (Davidson *et al.* 1991, Stark a Firestone 1995). Během před-inkubace ovšem nesmí dojít k vyčerpání organického substrátu a k limitaci uhlíkem.

**Mikroorganismy a procesy přeměny N by neměly být ovlivněny formou přidávané značící látky.** Kupříkladu, při stanovení rychlosti hrubé nitrifikace použijeme ke značení dusičnan draselný, ne dusičnan amonný, aby nedocházelo k ovlivnění substrátu ( $\text{NH}_4^+$ ) a neměřili jsme tak spíše potenciální, než aktuální rychlost nitrifikace.

U některých typů půd může dojít při měření hrubé amonifikace k velmi rychlé spotřebě  $^{15}\text{NH}_4^+$  a jeho transformaci na  $^{15}\text{NO}_3^-$ , přičemž velikost celkové zásoby neznačeného  $\text{NO}_3^-$  se téměř nezmění.  $^{15}\text{N}$  se v tomto případě nitrifikuje vyšší rychlostí než  $^{14}\text{N}$  (Stark a Schimel 2001, Watson *et al.* 2002). Problém mohou částečně řešit inhibitory nitrifikace (např.: acetylen, 3,4-dimethylpyrazol fosfát aj.), které můžeme ke vzorku přidat (Guiraud a kol. 1989, Chalk *et al.* 1990). Jejich použití s sebou ovšem nese mnohá další úskalí. Mohou sloužit jako substrát pro mikroorganismy, nemusí účinkovat stoprocentně a mohou ovlivnit i proces amonifikace. Pokud se uchýlíme k jejich použití je nezbytné jejich účinek na aktivitu mikrobiálního společenstva předem důkladně otestovat.

*Pozor! V literatuře se můžeme setkat s použitím tzv. párového značení, kdy se přidává značený dusičnan draselný společně se značeným síranem amonným. Tímto způsobem se autoři obvykle pokouší zjistit přesněji  $\text{NH}_4^+$  asimilaci a to odečtením rychlosti hrubé nitrifikace od rychlosti spotřeby  $\text{NH}_4^+$ . Tento přístup však nesplňuje podmínku, že ovlivnění mikroorganismů a procesů přeměny N formou přidávané značící látky bude minimální. Správnější přístup zahrnuje přidání  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  a  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  jednotlivě a tedy rozdělení vzorků do dvou sad.*

---

### 6.3.1 Stanovení hrubé mineralizace $^{15}\text{N}$ zředňovací metodou

Pokud je naším záměrem změřit hrubou amonifikaci a zároveň ve stejnou dobu i hrubou nitrifikaci, potřebujeme minimálně dva neznačené a čtyři značené půdní vzorky, z toho dva značené roztokem  $^{15}\text{NH}_4^+$  soli a dva značené roztokem  $^{15}\text{NO}_3^-$  soli. Zhomogenizované půdní vzorky o ideální vlhkosti necháme několik hodin předinkubovat (nutno předem otestovat), poté vezmeme dva vzorky a vyextrahujeme z nich dusík (viz. níže). Přesnou navážku vzorku určíme v závislosti na obsahu N a podle optimálního požadovaného množství N pro měření na hmotnostním spektrometru (obvykle 20 – 100  $\mu\text{g}$  N). Zbylé čtyři vzorky značíme  $^{15}\text{N}$ , dva roztokem  $^{15}\text{NH}_4^+$  soli a dva roztokem  $^{15}\text{NO}_3^-$  soli. Značené vzorky necháme inkubovat za stálé teploty po dobu 24 hodin a následně z nich také extrahujeme N. Vzorky extrahujeme třepáním s 0,5M roztokem  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (popřípadě roztokem 2M  $\text{KCl}$ ). Po centrifugování a zfiltrování vzorků extrakty připravíme pro vlastní stanovení množství N a poměru izotopů N na hmotnostním spektrometru. K tomu slouží **difúzní metoda (diffusion method, Brooks a kol. 1989)**.

#### 6.3.1.1 Difúzní metoda

Principem difúzní metody je přeměna  $\text{NH}_4^+$  z roztoku na plynný amoniak v zásaditém prostředí. Po přidavku  $\text{MgO}$  (nebo  $\text{NaOH}$ ) k půdnímu extraktu, difunduje  $\text{NH}_3$  z extraktu a je zachytáván na okyseleném filtru ( $\text{KHSO}_4$ ) v uzavřeném a dobře těsnícím systému (např. sérovka s gumovým víčkem a těsněním, umístěná na třepačku). V druhém kroku přidáváme Devardovu slitinu (50%  $\text{Cu}$ , 45%  $\text{Al}$ , 5%  $\text{Zn}$ ), což je činidlo způsobující redukci dusičnanů na volný amoniak, který je opět zachycen na kyselém filtru. Tak dochází k oddělení  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  z extraktu a jejich zakoncentrování pro stanovení množství N a poměru  $^{14}\text{N}:^{15}\text{N}$  na hmotnostním spektrometru.

V případě stanovení hrubé amonifikace (vzorky značené roztokem  $^{15}\text{NH}_4^+$  soli) necháme vzorek difundovat s  $\text{MgO}$  a vznikající  $\text{NH}_3$  zachytíme na filtru.

V případě stanovení hrubé nitrifikace (vzorky značené roztokem  $^{15}\text{NO}_3^-$  soli) postupujeme tak, že extrakt necháme nejprve difundovat s  $\text{MgO}$  bez zachycení na filtru. Poté provedeme difúzi s Devardovou slitinou a vznikající  $\text{NH}_3$  již jímáme na kyselém filtru<sup>16</sup>.

---

<sup>16</sup> Kyselé filtry připravíme z proužků teflonové pásky a dvou koleček filtračního papíru (průměr přibližně 0,5 cm, bezpopelnatý filtrační papír). Vždy dva filtry položíme na jeden proužek teflonu. Na každé kolečko napipetujeme 5  $\mu\text{l}$  2,5 M roztoku  $\text{KHSO}_4$ , ihned přeložíme volným koncem pásky a filtr

Dobu difúze (obvykle 3-7 dní) je nutno předem otestovat, přičemž zohledňujeme množství extraktu, množství dusíku ve vzorku a teplotu okolí (vyšší teplota obvykle mírně proces difúze urychlí).

Spolu s extrakty vzorků je, pro kontrolu správnosti průběhu difúze a následných měření, vhodné připravit řadu standardů a slepých stanovení (blank) a to jak difúzních, tak i ne-difúzních (pipetování přímo na filtr a vysušení). Se standardy a blanky se snažíme při přípravě zacházet stejně jako s pravými vzorky.

*alternativní přístupy: Existují i další metody, kterými je možné oddělit  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  z roztoku pro stanovení poměru izotopů. Metoda iontoměničů, kterou lze použít pro vodné extrakty a vzorky (Stickrod a Marshall 2000). Derivační metoda („the derivatization method“, Johnston et al. 1999), která však vyžaduje korekce vzhledem k frakcionaci izotopů během složitějších chemických reakcí, a proto není dosud příliš používána. Relativně novým způsobem pro analýzu  $^{15}\text{NO}_3^-$  je metoda denitrifikační (Sigman et al. 2001), kdy kultivací denitrifikačních bakterií dochází k přeměně  $\text{NO}_3^-$  na  $\text{N}_2\text{O}$ , který je zachytáván a následně analyzován na hmotnostním spektrometru. Výhodou této metody je velmi nízké množství N, které je pro analýzu potřeba (10-20 nmol). Jiným způsobem bez nutnosti kultivace bakterií je redukce  $\text{NO}_3^-$  na  $\text{N}_2\text{O}$  pomocí azidu sodného (McIlvin a Altabet 2005). Výhodou výše zmiňované difúzní metody oproti jiným přístupům je to, že je jednoduchá, relativně levná a netoxická.*

---

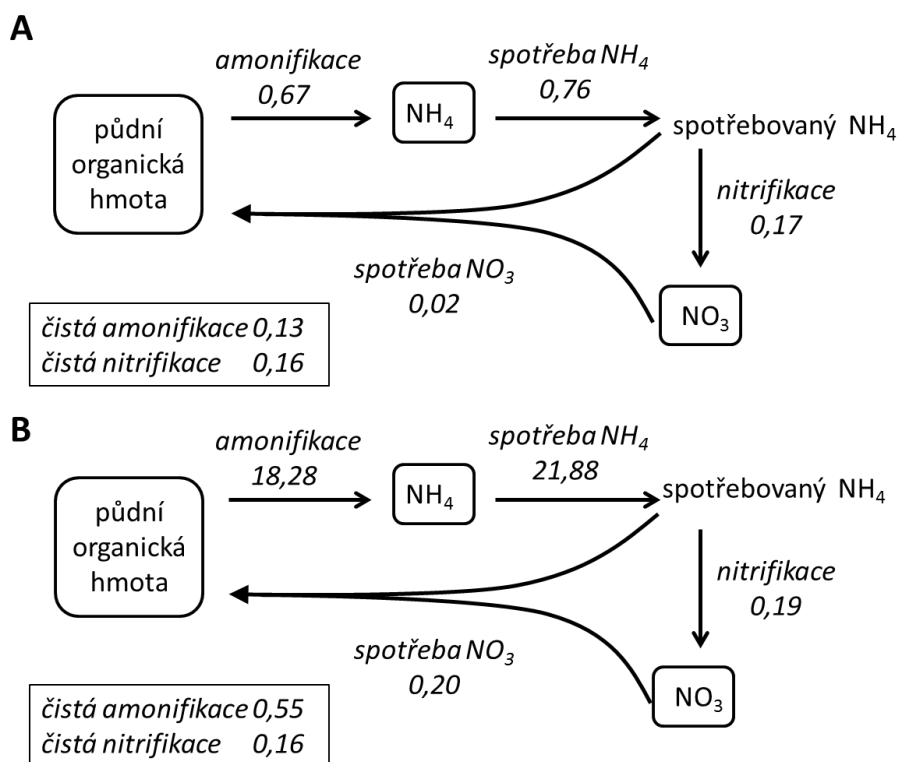
## 6.4 Aplikace, případové studie

### 6.4.1 Porovnání hrubých a čistých toků N v zemědělských a lučních půdách

Před rutinním zavedením zředovací metody převládal názor, že rychlosti hrubých a čistých procesů přeměny N jsou srovnatelné a to zejména v systémech s nízkým vstupem organické hmoty. Tlustos *et al.* (1998) porovnali hrubé a čisté toky N v půdách odebraných z dlouhodobě obhospodařovaných zemědělských a lučních půd (sečeno 125 let) nezatížených příliš atmosférickou depozicí ( $<15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ rok}^{-1}$ ). Přestože čisté toky nebyly v obou systémech výrazně rozdílné, luční půdy vykazovaly až téměř 30krát vyšší rychlosti hrubé amonifikace a asimilace N než půdy zemědělské (Obr. 6.4.1). Vzhledem k nízké rychlosti amonifikace bylo v zemědělsky obhospodařované půdě relativně dost amonného iontu nitrifikováno. Zatímco u luční půdy byla rychlost nitrifikace v porovnání s amonifikací zanedbatelná.

---

v pásce utěsníme přitlačením okolo jeho okrajů (např. otevřeným koncem zkumavky apod.). Pracujeme v rukavicích a připravené filtry neponecháváme volně na vzduchu (potenciální znečištění  $\text{NH}_3$  ze vzduchu). Dva filtry jsou schopny zachytit minimálně 200  $\mu\text{g N}$ . Po difúzi filtry sušíme 24 h v parách koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Uchováváme je uzavřené (např. v exsíkátoru) a pro analýzu balíme, vzhledem k jejich kyselosti, do cínových kapslí nejlépe 24 – 48 h před analýzou.



Obr. 6.4.1 Porovnání hrubých a čistých toků N v (a) zemědělských a (b) lučních půdách (upraveno podle Murphy *et al.* 2003 a Tlustos *et al.* 1998).

## 6.5 Seznam použité literatury

- BROOKS P.D. *et al.* (1989) Diffusion method to prepare soil extracts for automated <sup>15</sup>N analysis. *Soil Science Society of America Journal* 53 (6): 1707 – 1711.
- CHALK P.M. *et al.* (1990) Effect of a nitrification inhibitor on immobilisation and mineralisation of soil and fertilizer nitrogen. *Soil Biology & Biochemistry* 22: 533 – 538.
- DAVIDSON E.A. *et al.* (1991) Measuring gross nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification by <sup>15</sup>N isotopic pool dilution in intact soil cores. *Journal of Soil Science* 42: 335 – 349.
- DI H.J. *et al.* (2000) Isotopic dilution methods to determine the gross transformation rates of nitrogen, phosphorus, and sulfur in soil: a review of theory, methodologies, and limitations. *Australian Journal of Soil Research* 38: 213 – 230.
- DISE N.B. *et al.* (1998) Evaluation of organic horizon C:N ratio as an indicator of nitrate leaching in conifer forests across Europe. *Environmental Pollution* 102 (S1): 453 – 456.
- GUIRAUD G. *et al.* (1989) Mineralization of nitrogen in the presence of a nitrification inhibitor. *Soil Biology & Biochemistry* 21: 29 – 34.
- GUNDERSEN P. *et al.* (1998) Impact of nitrogen deposition on nitrogen cycling in forests: a synthesis of NITREX data. *Forest Ecology and Management* 101: 37 – 55.



- JOHNSTON A.M. *et al.* (1999) Isolation of  $\text{NO}_3^-$ -N as 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan-1) for measurement of  $\delta^{15}\text{N}$ . *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 13: 1531 – 1534.
- KIRKHAM D. & BARTHOLOMEW V.W. (1954) Equations for following nutrient transformations in soil, utilizing tracer data. *Soil Science Society of America Proceedings* 18: 33 – 34.
- KIRKHAM D. & BARTHOLOMEW V.W. (1955) Equations for following nutrient transformations in soil utilizing tracer data. II. *Soil Science Society of America Proceedings* 19: 189 – 192.
- MCILVIN M.R. & ALTABET M.A. (2005) Chemical conversion of nitrate and nitrite to nitrous oxide for nitrogen and oxygen isotopic analysis in fresh and seawater. *Analytical Chemistry* 77: 5589 – 5595.
- MURPHY D.V. *et al.* (1997) Method to label soil cores with  $^{15}\text{NH}_3$  gas as a prerequisite for  $^{15}\text{N}$  isotopic dilution and measurement of gross N mineralisation. *Soil Biology & Biochemistry* 29: 1731 – 1741.
- MURPHY D.V. *et al.* (1999) Comparison of  $^{15}\text{N}$  labelling methods to measure gross nitrogen mineralisation. *Soil Biology & Biochemistry* 31: 2015 – 2024.
- MURPHY D.V. *et al.* (2003) Gross nitrogen fluxes in soil: theory, measurement and application of  $^{15}\text{N}$  pool dilution techniques, *Advances in Agronomy* 79, 69 – 118.
- SCHIMEL J.P. (1996) Assumptions and errors in the  $^{15}\text{NH}_4^+$  pool dilution technique for measuring mineralisation and immobilisation. *Soil Biology & Biochemistry* 28: 827 – 828.
- SIGMAN D.M. *et al.* (2001) A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and freshwater. *Analytical Chemistry* 73: 4145 – 4153.
- STARK J.M. & FIRESTONE M.K. (1995) Isotopic labelling of soil nitrate pools using nitrogen-15-nitric oxide. *Soil Science Society of America Journal* 59: 844 – 847.
- STARK J.M. & SCHIMEL J.P. (2001) Errors in 'Overestimation of gross N transformation rates in grassland soils'. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1433 – 1435.
- STICKROD R.D. & MARSHAL J.D. (2000) On-line nitrate- $\delta^{15}\text{N}$  extracted from groundwater determined by continuous-flow elemental analyzer isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 14: 1266 – 1268.
- TLUSTOS P. *et al.* (1998) Short-term effects of nitrogen on methane oxidation in soils. *Biology & Fertility of Soils* 28, 64 – 70.
- VAN VEEN J.A. *ET AL.* (1984) Modelling C and N turnover through the microbial biomass in soil. *Plant and Soil* 76: 257 – 274.
- WATSON C.J. *et al.* (2002) Response to Stark and Schimel's letter to the editor published in *Soil Biology & Biochemistry* 33 (2001) 1433 – 1435. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 553 – 555.
- WESSEL W.W. & TIETEMA A. (1992) Calculating gross N transformation rates of  $^{15}\text{N}$  pool dilution experiments with acid forest litter: analytical and numerical approaches. *Soil Biology & Biochemistry* 24: 931 – 942.

## III. KYSLÍK A VODÍK

### 7 IZOTOPOVÁ FRAKCIONACE VODY

Jiří Šantrůček

#### 7.1 Proč prší v Praze lehčí voda než v Londýně?

Voda poháněna energií Slunce neustále cirkuluje mezi litosférou, biosférou a atmosférou. Složitost mechanismů, které toky vody ovlivňují vyžaduje, abychom měli pro jejich studium speciální nástroje. Jedním z takových nástrojů jsou stabilní izotopy. Sledování izotopové frakcionace vody v přirozeném prostředí dovoluje například rozdělit množství vody vypařující se z ekosystému na výpar z rostlin (transpiraci) a výpar z povrchu půdy (evaporaci). Dokážeme zjistit, zda stromy rostoucí na břehu řeky využívají vodu z říčního koryta nebo spíše z okolní půdy. Izotopové složení srážkové vody může sloužit jako jakási přirozená na satelitech nezávislá GPS stanice, a protože vše živé je na lokální vodě závislé, voda je nezbytným vstupem do našeho metabolismu a zanechává v něm svoji izotopovou stopu, i naše tělo a rostlinné nebo živočišné produkty jsou jakousi izotopovou adresou našeho pobytu, lokality, kde rostlina rostla nebo živočich přebýval. Migrační přírodovědné studie, ochrana přírody, forenzní vědy, archeologie, státní správa – to jsou příklady oborů a oblastí, které mají ze studia geograficky specifické frakcionace izotopů vody užitek. V této kapitole poznáme principy frakcionace vody při skupenských přeměnách a transportu vody v globálním měřítku, v krajině, v měřítku jedné rostliny, listu a buněk v něm, které jsou „křižovatkou“ toků vody a CO<sub>2</sub>. Ne ale mimoúrovňovou křižovatkou, kde by se CO<sub>2</sub> a voda míjely. Voda s oxidem uhličitým se v buňkách rostlin mísí a izotopově ovlivňují. Dozvíme se i o důsledcích jaké to přináší.

Sedmdesát procent plochy naší planety pokrývá voda oceánů, moří a sladkovodních jezer. Voda je součástí atmosféry, suchozemské vegetace, živočichů. I my jsme chodící „sáčky“ z dvou třetin naplněné vodou. Největší objem ale představuje voda v oceánech (1 360 000 TT, kde TT označuje teratunu tj. množství vody o objemu 1000 km<sup>3</sup>) a jen zlomek toho ale přesto uctyhodné množství asi 15 TT je v atmosféře Země ve formě vodní páry. Podívejme se na izotopové složení vody v těchto dvou rezervoárech.

Vodík a kyslík se vyskytuje ve dvou respektive třech stabilních izotopech (<sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H, <sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O a <sup>18</sup>O). Zatím pomineme existenci izotopu <sup>17</sup>O, kterého je velmi málo. Množství izotopů vyjadřujeme pomocí relativního poměru těžšího (a méně častého) k lehčímu (a častějšímu) izotopu jako δ<sup>2</sup>H (nebo δD protože izotop <sup>2</sup>H se nazývá deuterium) a δ<sup>18</sup>O. Už víme, že souslovím „relativní poměr“ rozumíme poměr zastoupení stabilních izotopů ve vodě z našeho vzorku (např. [D/<sup>1</sup>H]<sub>v</sub>) vztažený na tentýž poměr ve vodě, kterou prohlásíme za standard ([D/<sup>1</sup>H]<sub>s</sub>). Tedy δD = ([D/<sup>1</sup>H]<sub>v</sub>/[D/<sup>1</sup>H]<sub>s</sub>) - 1 a podobně pro kyslík δ<sup>18</sup>O = ([<sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O]<sub>v</sub>/[<sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O]<sub>s</sub>) - 1. Ve výrazech je člen -1 a jeho nahrazením za - [D/<sup>1</sup>H]<sub>v</sub>/[D/<sup>1</sup>H]<sub>s</sub> resp. [<sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O]<sub>v</sub>/[<sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O]<sub>s</sub> vidíme, že δ vlastně informuje o relativní odchylce v obsahu těžšího izotopu ve vzorku oproti standardu: δD = ([D/<sup>1</sup>H]<sub>v</sub> - [D/<sup>1</sup>H]<sub>s</sub>) / [D/<sup>1</sup>H]<sub>s</sub> a podobně δ<sup>18</sup>O = ([<sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O]<sub>v</sub> - [<sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O]<sub>s</sub>) / [<sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O]<sub>s</sub>. Pokud má být vyjádřena hodnota δ jako část z tisíce (promile, ‰), násobí se ještě uvedené δD a δ<sup>18</sup>O tisícem. Za standard byla ustavena tzv. standardní střední oceánská voda (*Standard Mean Ocean*

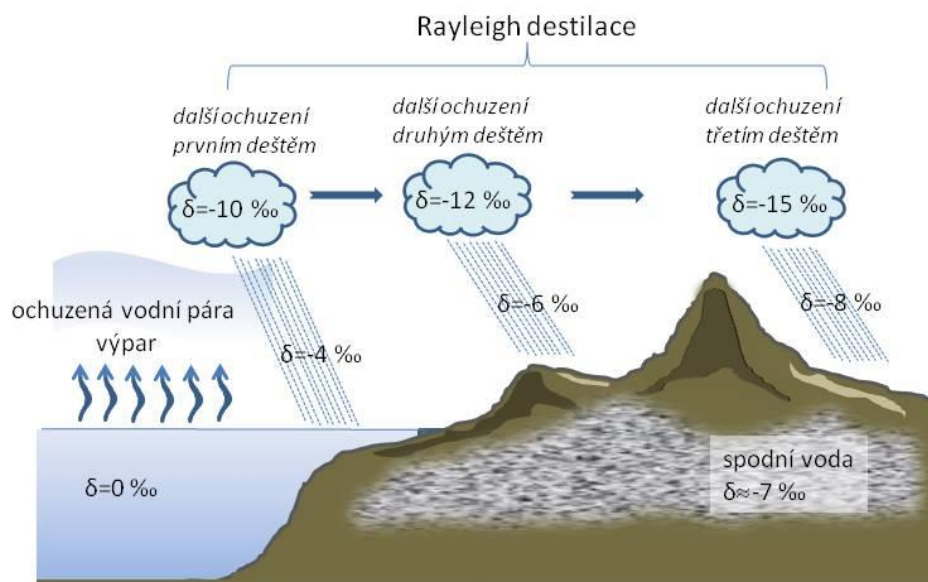
Water, SMOW). Ta je samozřejmě potřebná ve všech izotopových laboratořích ale není jí možné jednoduše nabrat z moře nebo oceánu; kupuje se od Mezinárodní atomové agentury ve Vídni, která ji pečlivě míchá z izotopově upravené destilované vody a udržuje ve speciálních tancích její zásobu. Proto se na začátek SMOW přidává ještě písmeno V označující anglický název Vídne, Vienna, tedy VSMOW<sup>17</sup>. Ve vodě vyskytující se na Zemi se  $\delta$  pohybuje v rozmezích -495 až +129 ‰ pro  $\delta D$  a -62,8 až +31,3 ‰ pro  $\delta^{18}O$  (Coplen *et al.* 2002). Chyba při stanovení (resp. standardní odchylka)  $\delta D$  a  $\delta^{18}O$  bývá při analýzách současnou běžnou technikou pod 1 ‰ a 0,2 ‰, proto můžeme poměrně spolehlivě sledovat izotopové složení vody v různých zdrojích na naší planetě. Podívejme se, co je prvotní příčinou tak rozsáhlé izotopové frakcionace.

Budeme-li měřit izotopové složení vody v oceánech, zjistíme, že asi v 98,8 % má molekula vody izotopovou podobu  $^1H_2^{16}O$ . Přibližně 0,200 % molekul bude obsahovat těžký kyslík,  $^1H_2^{18}O$  a jen asi u 0,015 % molekul nalezneme těžký vodík (deuterium) místo lehkého,  $^1HD^{16}O$ . Pokud ale stejné měření uděláme s vodou, kterou získáme z atmosféry nad hladinou oceánu (pečlivě zkondenzujeme všechnu vodní páru v určitém objemu vzduchu), zjistíme, že je ochuzená o těžší izotopy ve srovnání s kapalnou vodou: bude obsahovat ne 0,200 ale 0,199 %  $^1H_2^{18}O$  a ne 0,015 ale 0,008 %  $^1HD^{16}O$ . V předchozí větě jsme zdůraznili slovo „všechnu“. Když bychom zkondenzovali totiž jen část vodní páry nebo analyzovali vodu z přirozených srážek (dešťovou), zjistíme, že nebude tak ochuzená proti kapalně vodě jak jsme uvedli (o 0,001 % pro  $^1H_2^{18}O$  a o 0,007 % pro  $^1HD^{16}O$ ) ale méně. Příčina je, zjednodušeně řečeno, v tom, že během kondenzace se dříve a snáze sráží těžší voda než lehčí. Ta pak vypadává z atmosféry jako déšť, lehčí izotopy zanechává v atmosféře jako vodní páru, kterou pak vzdušná proudění posouvají obvykle nad kontinent a obvykle do větší výše<sup>18</sup>. Zde se izotopově „vylehčená“ vodní pára při nižší teplotě opět sráží a přináší další déšť a vodu využitelnou suchozemskými rostlinami a živočichy. Tento hydrologický proces je znázorněn na obrázku 7.1.1.

---

<sup>17</sup> Izotopové poměry SMOW a VSMOW jsou:  $^2H/^1H=155,95\pm 0,08\times 10^{-6}$  a  $^{18}O/^{16}O=2005,2\pm 0,45\times 10^{-6}$

<sup>18</sup> 86 % globálního výparu pochází z oceánů a vodních ploch, asi 90 % této vody spadne zpět do moří jako srážky a zbývajících 10 % je odneseno nad kontinenty. Tato voda pak tvoří asi 30 % srážek nad kontinenty, zbytek tj. 70 % kontinentálních srážek pochází z výparu a transpirace (tzv. evapotranspirace) kontinentů (Vrabec 2011).



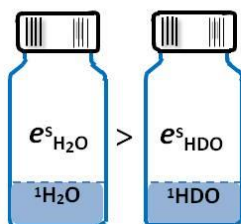
Obr. 7.1.1 Frakcionace izotopů kyslíku při výparu vody z oceánů, transportu vody nad kontinent a srážkách. Hodnoty  $\delta$  ukazují izotopové složení oceánské vody, vodní páry v oblacích a dešťové vody. V důsledku diskriminace těžší vody při výparu je vodní pára ochuzená o  $^{18}\text{O}$  proti vodě v oceánech (proto je  $\delta$  vypařené vody záporné). Ochuzení se zvyšuje (hodnota  $\delta$  se stává více zápornou) při přechodu oblaků dále od oceánu protože při kondenzaci a dešti vypadává přednostně těžší izotop a tím se zdrojový oblak stává izotopově lehčí a lehčí. Takový proces opakované destilace se nazývá Rayleigh-ova destilace. Izotopové složení podzemní vody je průměrem složení srážek, které zasakují a doplňují rezervoár podzemní vody. Kvalitativně stejná ale velikostí větší diskriminace bude probíhat i v případě vodíku (výparu a kondenzace deuteriované vody HDO).

Na otázku z úvodu této kapitoly „Proč prší v Praze lehčí voda než v Londýně?“ odpovídá obrázek 7.1.1. Londýn je blíž oceánu než Praha, a proto na pražany dopadá izotopově lehčí dešť než na londýňany (rozdíl celoročního průměru  $\delta^{18}\text{O}$  ve srážkové vodě mezi Londýnem a Prahou je 1,1 ‰ pro  $\delta^{18}\text{O}$  a 8 ‰ pro  $\delta\text{D}$ <sup>19</sup>).

<sup>19</sup> Výpočty izotopových rozdílů srážkové vody je možné provést pro jakákoli různá místa na Zemi, pro která známe zeměpisné souřadnice a nadmořskou výšku pomocí internetového kalkulatoru na serveru Waterisotopes.org ([http://wateriso.utah.edu/waterisotopes/pages/data\\_access/oipc.html](http://wateriso.utah.edu/waterisotopes/pages/data_access/oipc.html)). Souřadnice a nadmořskou výšku jakéhokoliv místa zjistíme na GoogleEarth.

## 7.2 Izotopová frakcionace vody pod fyzikálním drobnohledem

Z pozorování rozdílu v izotopovém složení vody v oceánech a v atmosféře nad ním plyne jasný závěr, že během výparu a následného transportu vodní páry dochází k diskriminaci těžších izotopů vody. Izotopově těžší voda má hendicap ve srovnání s lehčí vodou, který vyplývá z její menší rychlosti molekulárního pohybu a nižší pravděpodobnosti vstupu do reakcí.<sup>20</sup> Podívejme se na věc více v detailu a v termínech, které známe už z předchozích kapitol: rovnovážné a kinetické frakcionace. Při výparu dochází k rovnovážné frakcionaci. Zorganizujme pokus s dvěma uzavíratelnými nádobami namalovanými na obr. 7.2.1. V jedné z nich bude výhradně lehká voda ( $^1\text{H}_2^{16}\text{O}$ ) a v druhé voda kde všechny molekuly budou mít izotopovou podobu  $^1\text{H}^2\text{H}^{16}\text{O}$ . Po uzavření se do plynu nad kapalinou (který jsme předem zbavili vodní páry) bude vypařovat voda a po čase se ustaví rovnováha, kdy se rychlost výparu rovná rychlosti návratu do kapalně fáze. Pokud změříme tlak vodní páry nad kapalinou, zjistíme, že nad lehkou vodou bude vyšší než nad izotopově těžší vodou jak naznačuje schéma na obrázku 7.2.1.



Obr. 7.2.1 Izotopová frakcionace vody během výparu. Tlak nasycené vodní páry v rovnováze s kapalinou vodou ( $e^s$ ) je vyšší nad hladinou lehké vody ( $^1\text{H}_2\text{O}$ ) než nad hladinou vody, která má v molekule těžký izotop vodíku (deuterium,  $^1\text{HDO}$ ), protože molekula těžší vody potřebuje k vypaření více

<sup>20</sup> Pokusme se předpovědět, kolikrát bude např. molekula vody s těžším kyslíkem ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) pomalejší než molekula s lehčím kyslíkem ( $\text{H}_2^{16}\text{O}$ ). Při stejné teplotě bude kinetická energie ( $KE$ ) obou molekul stejná, označme zkráceně symboly  $^{16}KE = ^{18}KE$ . Pokud se vám vybaví vzorečky z fyziky na základní nebo střední škole, bude vám povědomý výraz pro výpočet kinetické energie:  $KE = 1/2 \cdot m \cdot v^2$ , kde  $m$  je hmotnost tělesa (molekuly) a  $v$  je rychlost jeho pohybu. Lehčí a těžší izotop vody se liší hmotností a rychlostí pohybu a pro obě zkoumané molekuly tedy bude platit:  $1/2 \cdot ^{16}m \cdot v^2 = 1/2 \cdot ^{18}m \cdot v^2$ . Relativní molekulové hmotnosti vody dokážeme určit;  $^{16}m = 18$  a  $^{18}m = 20$ . Dosadíme do předchozí rovnosti a zjistíme, že poměr rychlostí obou molekul vody je:  $v^{16}/v^{18} = (^{18}m/^{16}m)^{0.5} = (20/18)^{0.5} = 1,054$ . Tedy lehčí molekula vody bude (v plynu) difundovat asi o 5 % rychleji než ta těžší. Obráceně, těžší molekula bude pomalejší a bude při svém pohybu proto také absolvovat méně srážek za jednotku času s ostatními molekulami. Proto bude rychlost reakcí, do kterých bude případně vstupovat, nižší.

energie než molekula lehčí vody. Předpokládá se, že kyslík je izotopově stejný v obou nádobkách.

Příčinou rozdílu tlaků nasycené páry je rovnovážná izotopová frakcionace vody při výparu: molekuly těžší vody potřebují k přechodu do plynné fáze více energie než molekuly izotopově lehčí vody. Velikost frakcionace je možné vyjádřit rovnovážným frakcionačním faktorem  $\varepsilon^*$  pro HDO a pro  $^1\text{H}_2^{18}\text{O}$  :

$$\varepsilon_D^* = \left[ \frac{\left(\frac{D}{H}\right)_{\text{kapalina}}}{\left(\frac{D}{H}\right)_{\text{plyn}}} - 1 \right] \cdot 1000 \quad \varepsilon_{^{18}\text{O}}^* = \left[ \frac{\left(\frac{^{18}\text{O}/^{16}\text{O}}{\right)_{\text{kapalina}}}{\left(\frac{^{18}\text{O}/^{16}\text{O}}{\right)_{\text{plyn}}} - 1 \right] \cdot 1000 \quad 7.2.1a,b$$

Jejich hodnoty (při 20 °C) jsou  $\varepsilon_D^*=84$  ‰ a  $\varepsilon_{^{18}\text{O}}^*=9,8$  ‰, a proto je vodní pára v rovnováze s kapalnou vodou ochuzena v deuteriu o 84 ‰ a v kyslíku  $^{18}\text{O}$  o 9,8 ‰ oproti kapalně vodě. Podobně při kondenzaci (např. v mracích) se budou hromadit molekuly vody s těžšími izotopy v kapalně fázi a vypadávat přednostně.

Vypařením ale frakcionační procesy nekončí, protože se vodní pára přemísťuje difuzí přinejmenším přes hraniční vrstvu plynu, kde dochází jen k laminárnímu proudění, do volné (turbulentně míchané) atmosféry. V listech rostlin, které ztrácejí vodu transpirací, se navíc musí voda „prodifundovat“ mezibuněčnými prostory a průduchovými póry ven z listu. V těchto případech přináší handicap těžším molekulám vody už známá kinetická frakcionace vyjádřená frakcionačním faktorem  $\varepsilon_k$ . Analogicky s kinetickou frakcionací  $\text{CO}_2$  platí také pro vodu, že kinetická frakcionace během difuze je odvozená od poměru difuzních koeficientů  $D$ :

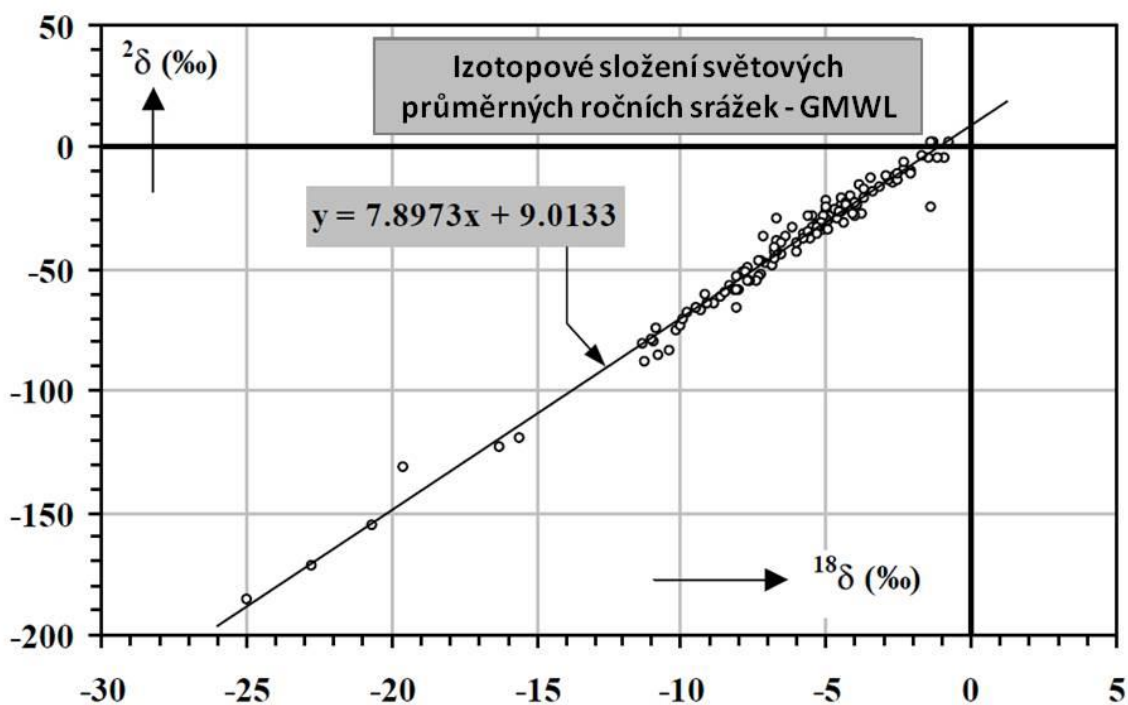
$$\varepsilon_{k\_D} = \left[ \frac{D_{\text{H}_2\text{O}}}{D_{\text{HDO}}} - 1 \right] \cdot 1000 \quad \varepsilon_{k\_^{18}\text{O}} = \left[ \frac{D_{\text{H}_2^{16}\text{O}}}{D_{\text{H}_2^{18}\text{O}}} - 1 \right] \cdot 1000 \quad 7.2.2a,b$$

Jejich hodnoty při difuzi v klidném vzduchu jsou  $\varepsilon_{k\_D}=28$  ‰ a  $\varepsilon_{k\_^{18}\text{O}}=30$  ‰ a jsou jen málo závislé na teplotě. Při difuzi napříč hraniční vrstvou vzduchu jsou ale nižší ( $\varepsilon_{k\_D}=13$  ‰ a  $\varepsilon_{k\_^{18}\text{O}}=15$  ‰). Opět jako v případě  $\text{CO}_2$ , pokud máme situaci, že difuze klidnou a laminární vrstvou následují v serii, jak je tomu např. při transportu vody ven z listu, výsledný kinetický frakcionační faktor se vypočítá jako vážený průměr z obou, kde vahou jsou difuzní vodivosti klidné a laminárně míchané vrstvy,  $g_s$  a  $g_a$ :  $\varepsilon_{k\_D}=[(g_s \cdot 28)+(g_a \cdot 13)]/(g_s+g_a)$ .

### 7.3 Meteorická přímka ukazuje co se s vodou dělo v hydrologickém cyklu

Nyní, když známe význam a hodnoty základních faktorů zodpovědných za rozdíly v izotopovém složení vody v přírodě, porozumíme snadno tomu, co se můžeme dozvědět o vodě pokud kombinujeme oba izotopové údaje,  $\delta^{18}\text{O}$  a  $\delta\text{D}$ . Při fázových přechodech vody se oba, kyslík i vodík frakcionují současně a poměr jejich rovnovážných frakcionačních faktorů,  $\varepsilon_D^*/\varepsilon_{^{18}\text{O}}^*$  se rovná přibližně číslu 8 ( $84/9,8 \approx 8,6$ ). Pokud tedy voda prochází pouze fázovými přechody z kapaliny do plynné fáze (výpar z oceánů) nebo opačně (kondenzace v mracích), bude se uplatňovat téměř výhradně rovnovážný typ frakcionace. Pak nepřekvapí, že pokud vyneseme do grafu hodnoty  $\delta\text{D}$  (na ose y) proti  $\delta^{18}\text{O}$  (na ose x) a proložíme regresní přímku, bude její sklon blízký hodnotě 8 a koeficient determinace blízký jedničce ( $r^2 \approx 0,95$ ). Průsečík přímky s osou y (tedy hodnota  $\delta\text{D}$  při

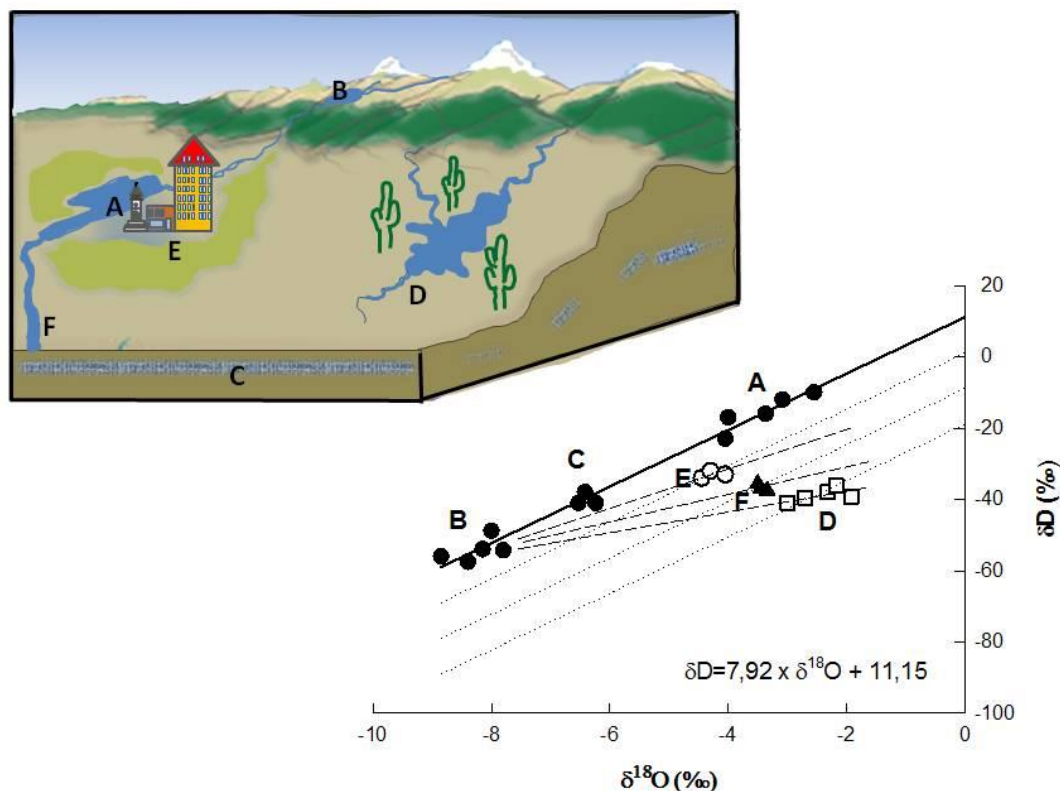
$\delta^{18}\text{O}=0$ ) je blízký  $\delta\text{D}=10$ . Této skutečnosti se poprvé všiml geochemik Harmon Craig (1926-2003) při hodnocení dat izotopového složení tzv. meteorické vody (tj. vody, která je součástí globálního koloběhu vody; všimněte si, že jde o meteorickou, ne meteoritickou ani meteorologickou vodu) pocházející z různých míst zeměkoule. Proto dostala závislost název „Globální meteorická vodní přímka“ (angl. *Global Meteoric Water Line*, GMWL). Příklad GMWL je na obr. 7.3.1



Obr. 7.3.1 Vztah mezi zastoupením izotopu  $^{18}\text{O}$  ( $^{18}\delta$ ) a D ( $^2\delta$ ) ve srážkové vodě na různých stanicích sítě GNIP (*Global Network for Isotopes in Precipitation*). Každý bod představuje alespoň desetiletý průměr celoročních srážek na dané stanici. Regresní přímka ukazuje dobrou shodu s globální meteorickou vodní přímkou, GMWL (podle dat Mezinárodní agentury pro atomovou energii, IAEA, <http://www.iaea.org>).

Ze zmíněného plyne, že GMWL je možné zapsat ve tvaru  $\delta\text{D}=\delta^{18}\text{O} \times 8 + d$ , kde  $d$  je tzv. přebytek deuteria (angl. *deuterium excess*), který má pro srážkovou vodu hodnotu blízkou 10. Důležité je, že se jedná o vodu z atmosférických srážek, případně o vodu uloženou ve vrstvách hornin v podzemí. Pokud budeme analyzovat vodu, která byla vystavena intenzivnímu výparu, zjistíme, že její hodnoty budou ležet mimo globální přímku, protože nedochází jen k rovnovážné ale i ke kinetické frakcionaci (přenosu vodní páry). Také poloha dat na přímce (více nebo méně záporné hodnoty  $\delta^{18}\text{O}$  a  $\delta\text{D}$ ) ukazují z jakých podmínek nebo oblastí voda pochází. K frakcionaci totiž nedochází jen vlivem opakovaného deště při přenosu mraků nad kontinent jak ukazuje obrázek 7.1.1 ale i řadou dalších vlivů. Jedním z nich je teplota při které v mracích dochází ke kondenzaci, a proto i nadmořská výška. Se snižující se teplotou vypadá stále ochuzenější voda, proto ve

vysokých horách jsou dešťové nebo sněhové srážky izotopově chudší než v nížině. Tyto a další účinky na izotopové složení vody v krajině jsou znázorněny na obr. 7.3.2



Obr. 7.3.2 Změny izotopového složení vody v modelovém člověkem využívaném hydrologickém systému. Voda v nádrži (A) poblíž města pod horami má izotopové složení dané složením místních srážek, které jsou bohatší na těžké izotopy než srážky v horách a horském jezeru (B). Protože voda v obou rezervoárech nepodléhá přílišnému výparu, leží obě skupiny bodů na meteorické přímce (GMWL, silná plná čára a rovnice přímky v grafu) se stejnou hodnotou přebytku deuteria  $d \cong 10 \text{ ‰}$  (průsečík s osou  $\delta D$ ). Podobně i voda v podzemním rezervoáru (C), která se doplňuje během roku z obou zdrojů tj. srážek v nížině i v horách, a proto je izotopově mezi body A a B. Podzemní voda má typicky malou sezónní variabilitu díky dlouhé době zdržení. Voda, která stéká z hor a protéká aridní oblastí (body D) se silně odpařuje a tím se obohacuje o těžší izotopy v důsledku kinetické frakcionace. Proto se přímka výparu (čárkovaně B-D) odchyluje od GMVL, má menší sklon než 8 a hodnota  $d$  se snižuje z +10 až na -20 ‰ – viz průsečík tečkované čáry s osou  $\delta D$ ). Voda, ve vodovodním řadu ve městě (E, kohoutková voda) svojí sníženou hodnotou  $d=0$  ukazuje, že jejím zdrojem je jak nádrž A plněná lokálními srážkami a vodou stékající z hor (B), ale částečně i obohacená voda z nádrže D. Pokud voda, která vytéká z osídlené oblasti (F) protéká také aridní oblastí nebo se mísí s vodou D, bude její izotopové složení mezi E a D (upraveno podle Bowen *et al.* 2007).

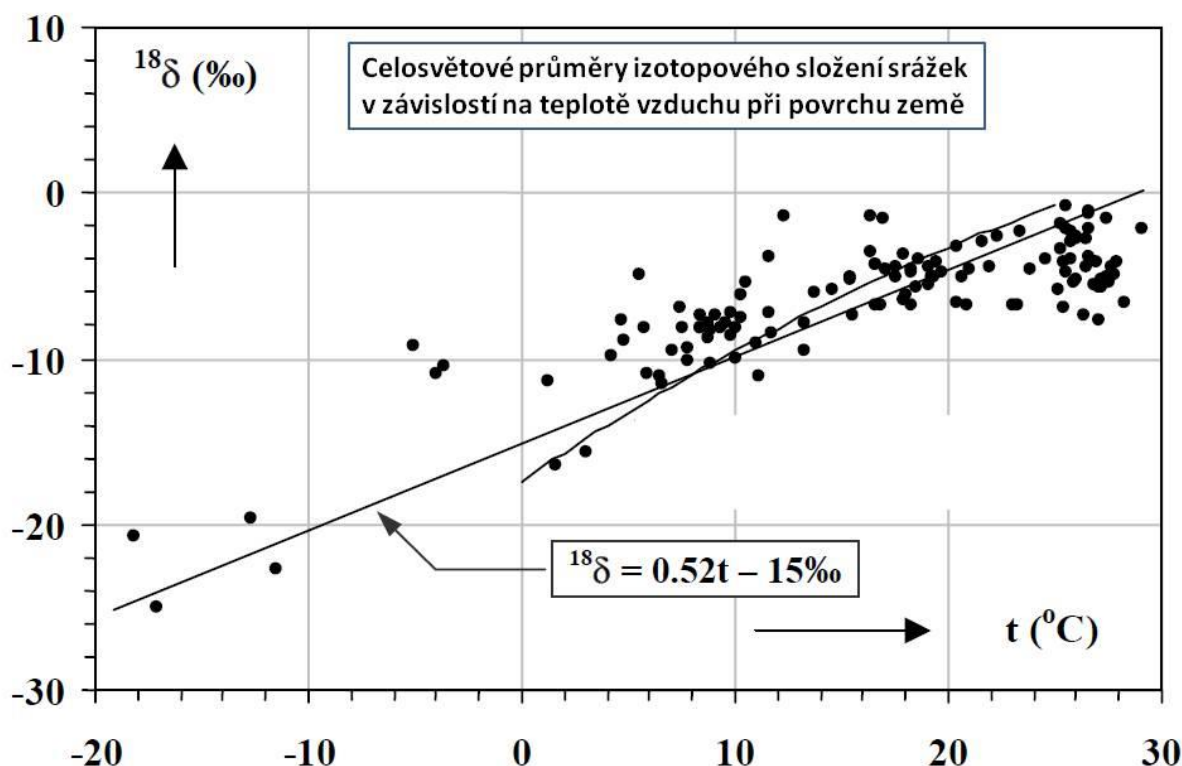
#### 7.4 Další faktory ovlivňující frakcionaci vody v krajině, izotopové mapy

Zatím víme, že čím dál jsme od oceánu, tím izotopově lehčí budou dešťové nebo sněhové srážky. Víme také, že podobnou roli hraje nadmořská výška; čím výše půjdeme do hor, tím bude déšť (sníh) izotopově lehčí (např.  $\delta D$  klesá v nižších nadmořských



výškách o 1,6 ‰ a ve vyšších o 4,8 ‰ na každých 100 m výšky). Stručněji, víme o tzv. kontinentálním účinku a efektu nadmořské výšky. Aby byl obraz distribuce izotopů vody po naší planetě úplný, musíme se zmínit ještě o vlivu zeměpisné šířky, vlivu ročního období a efektu množství srážek.

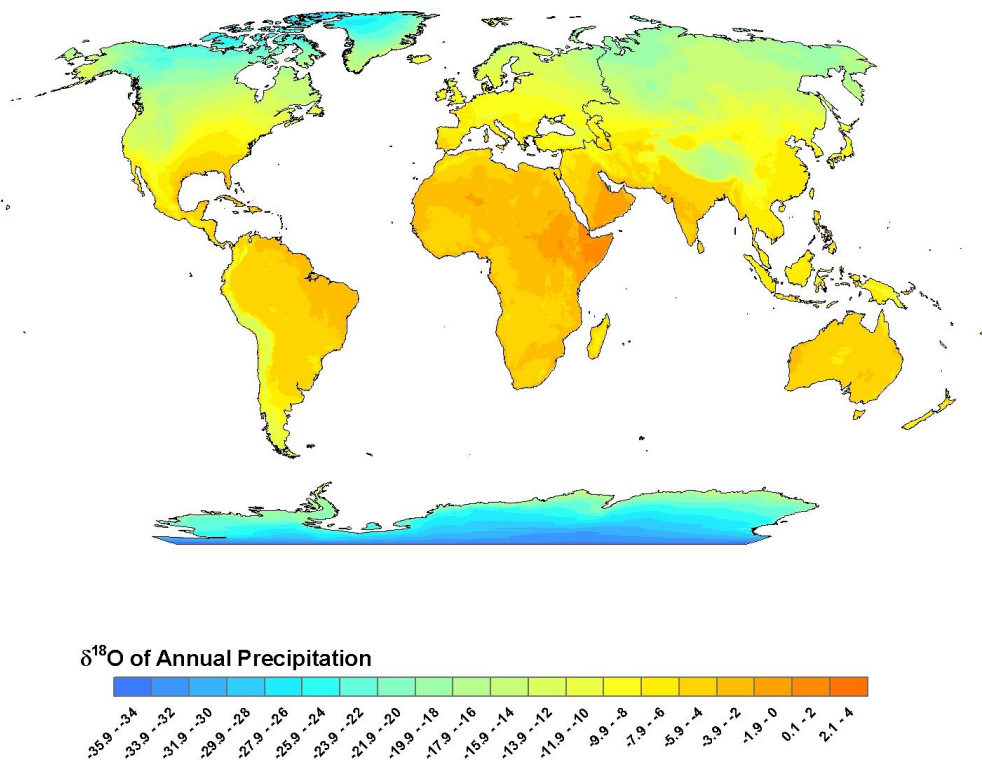
Výsledek experimentu z obrázku 7.2.1, tedy míra rovnovážné izotopové frakcionace při výparu (a kondenzaci) je závislý na teplotě. Podle očekávání, čím bude teplota vzduchu do kterého se voda vypařuje vyšší, tím relativně více těžších molekul vody se vypaří, tj. budou se méně diskriminovat proti lehčím. Přeneseme-li tuto závislost do měřítka zeměkoule, nepřekvapí, že výpar a tím i déšť v rovníkových oblastech bude izotopově těžší než nad studenými póly Země. Graf 7.4.1 sestrojený z celosvětových měření izotopů ve srážkách ukazuje lineární závislost na povrchové teplotě vzduchu v chladných oblastech a mírně zakřivenou při teplotách panujících v subtropickém a tropickém pásmu.



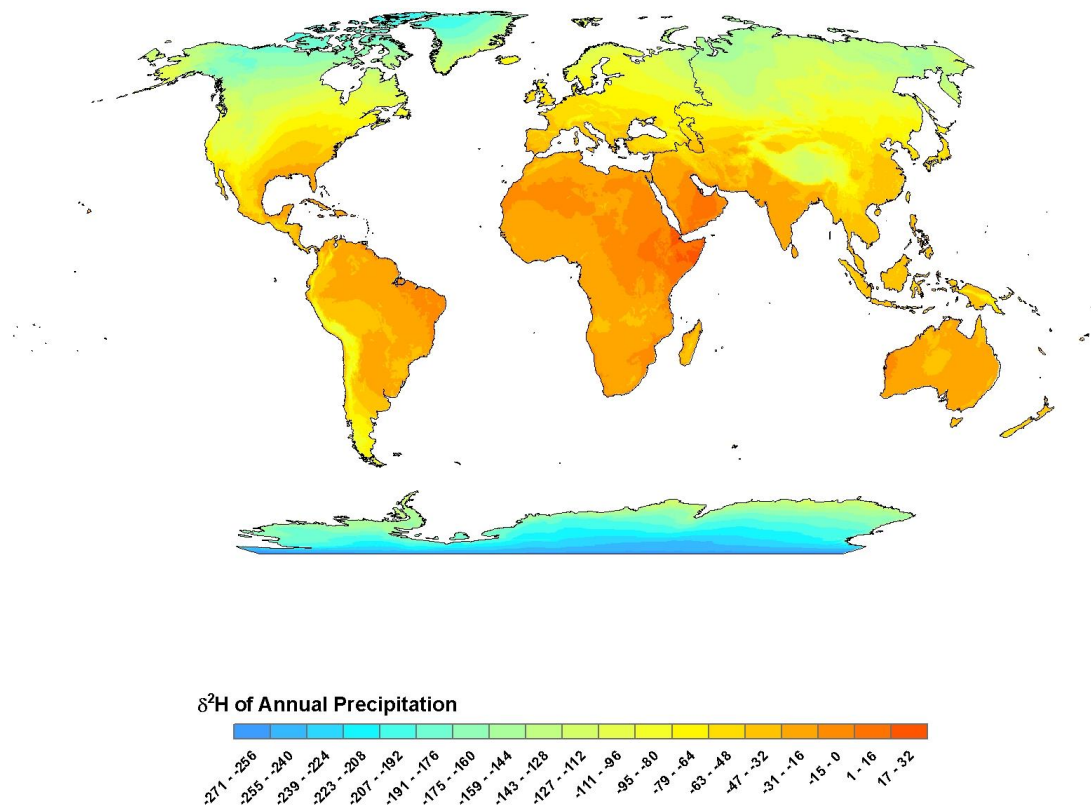
Obr. 7.4.1 Vliv průměrné roční teploty na zastoupení  $^{18}\text{O}$  ve srážkách. Body ukazují průměry hodnot z desetiletých měření izotopových hodnot ve srážkách vážených množstvím srážkové vody a stejně dlouhých měření průměrné roční povrchové teploty na oceánských, pobřežních, vnitrozemských a (ant)arktických stanicích (podle IAEA, zprávy GNIP).

Vliv zeměpisné šířky je tedy dán hlavně klesající teplotou směrem od rovníku k pólům. Podobný důvod mají i izotopové rozdíly srážkové vody během roku: v zimě budou srážky izotopově nejlehčí a v létě nejtěžší (amplituda oscilací zima-léto byla 10 až 12 ‰ pro  $\delta^{18}\text{O}$  podle záznamu z Řezna/Regensburg z let 1978-1985). Navíc ještě obecně platí, že se izotopové složení poněkud mění v průběhu deště a závisí na množství vody,

kerou dešť přinese: Na počátku deště přší těžší voda než když už pršet přestává. Tropické bouře a hurikány provázené velmi intenzivní srážkovou činností jsou izotopově neobyčejně ochuzené o těžší izotopy (až o 10 ‰ v  $\delta^{18}\text{O}$  v oku cyklonu) a tento fakt spolu s izotopovým „otiskem“ v celulóze letokruhů stromů lze využít k historické inventarizaci hurikánů (např. Mora *et al.* 2007). Jak se dozvíme dále, srážkovou vodu totiž přijímají rostliny (stromy) a kyslík a vodík v ní obsažené využívají k produkci strukturálních metabolitů mezi jinými i celulózy, která se datovatelným způsobem ukládá v letokruzích. V souhrnu, izotopové složení srážkové vody je závislé na vzdálenosti od oceánu, nadmořské výšce, zeměpisné šířce, sezóně během roku a intenzitě deště. Tedy na faktorech ovlivňujících pohyb vzdušných mas, který není snadné předpovědět. Přesto máme zájem znát globální a časové rozdělení izotopů srážkové vody a to s co nejvyšším rozlišením. Proto vznikl při hydrologickém oddělení Mezinárodní agentury pro atomovou energii (IAEA) celosvětový projekt a síť stanic monitorujících izotopové složení dešťových a sněhových srážek pod názvem *Global Network for Isotopes in Precipitation*. Výsledkem několikaletých měření byly podklady pro zhotovení izotopových srážkových map. Matematickými postupy z podkladů vznikly vyhlazené (tj. s plynulými přechody) srážkové izotopové mapy pro každý měsíc v roce a každé místo na Zemi, zvláště pro izotop  $^{18}\text{O}$  a pro D. Zohledněním množství srážek specifických pro každý měsíc a místo (vážením podle množství srážek) pak vznikly celoroční globální mapy, které jsou na následujících obrázcích (obr. 7.4.2, 7.4.3)



Obr. 7.4.2 Globální zastoupení izotopu  $^{18}\text{O}$  v úhrnných ročních srážkách. Mapa převzata z internetového zdroje [http://wateriso.utah.edu/waterisotopes/pages/data\\_access/figures.html](http://wateriso.utah.edu/waterisotopes/pages/data_access/figures.html), kde jsou k dispozici i mapy pro jednotlivé měsíce a detaily kontinentů.



Obr. 7.4.3 Globální zastoupení izotopu deuteria v úhrnných ročních srážkách. Mapa převzata z internetového zdroje [http://wateriso.utah.edu/waterisotopes/pages/data\\_access/figures.html](http://wateriso.utah.edu/waterisotopes/pages/data_access/figures.html), kde jsou k dispozici i mapy pro jednotlivé měsíce a detaily kontinentů.

## 7.5. Voda v půdě a v rostlině

### 7.5.1. Voda v půdě, evapotranspirační tok a rozlišení jeho složek

Už jistě tušíte, že izotopové složení vody v rostlině se bude odvozovat od zdroje této vody, tedy hlavně od vody v půdě. A voda v půdě pak hlavně od srážkové a případně od podzemní vody, kde sahá výše. Má to ale jeden háček a tím je výpar. Víme z předchozího, že výpar způsobuje ochuzení vodní páry o těžší izotopy. Podobně bude pára vypařená z povrchu vlhké půdy izotopově lehčí než kapalná voda v této povrchové vrstvičce a bude proto za sebou v půdě zanechávat těžší vodu (čistě jen jako důsledek zákona zachování hmoty: bude-li na jedné straně uzavřené soustavy koncentrace těžké vody ubývat, musí na druhé straně její koncentrace růst). Voda v povrchové vrstvě půdy bude proto během výparu izotopově „těžknout“ a molekuly těžší vody budou více nebo méně snadno (podle transportních vlastností půdy a obsahu vody v půdě) difundovat zpět

do větší hloubky v profilu půdy podle jejich koncentračního gradientu. Nepřekvapí proto, že když budete odebírat vzorky půdy z jednotlivých hloubek profilu a analyzovat v nich obsaženou vodu, zjistíte, že obohacení o těžší izotopy strmě stoupá směrem k povrchu půdy. Toto progresivní obohacení se odehrává v horních asi 0,1-0,5 m profilu a je významné, protože je součástí metody, kterou můžeme kvantitativně rozdělit celkový výpar z porostu (evapotranspiraci,  $ET$ ) na výpar z povrchu půdy (evaporaci,  $E$ ) a výpar z rostlin přes průduchové štěrby (transpiraci,  $T$ ).  $T$  je za obvyklých podmínek mnohem větší než  $E$  (např. poměr  $E/T$  u vzrostlého porostu pšenice bývá v jednotkách procent) ale běžnými metodami, např. mikrometeorologickými měřeními nebo eddy-kovarianční metodou, lze měřit pouze celkový tok  $ET$ , nelze jej rozlišit na toky  $T$  a  $E$ . Rostliny, hlavně víceleté byliny, keře a stromy, mají kořeny a přijímají vodu většinou z hlubších vrstev půdy alespoň několik decimetrů pod povrchem, vedou ji svým tělem do listů a transpirací přes průduchy ji z listů ztrácejí, a to vše bez výraznějších izotopových změn. Tedy transpirační voda je izotopově většinou stejná s hlubší půdní vodou<sup>21</sup>. Naproti tomu voda, která se vypařuje ze sice obohacené povrchové půdní vody, bude výrazně chudší na těžší izotopy ve srovnání s transpirační vodou z listů. Také se vám to zdá nelogické? Proč by vodní pára, která se vypařuje z listu, měla mít stejný izotopový signál jako zdrojová voda (tj. hluboká půdní voda) a vodní pára, která se vypařila z povrchu půdy, měla být výrazně ochuzená proti vodě při povrchu půdy? Berme zatím tuto zdánlivou nelogičnost jako fakt, k jehož pochopení se dobereme později. Zatím přijměme jako vysvětlení to, že voda v půdě nikdy nedosáhne izotopově ustáleného stavu, kdežto v listu je tento stav běžný (více v kapitole o vodě v listu). Ve volné atmosféře se tedy míchá vodní pára po vypaření ze dvou izotopově odlišných zdrojů: a) z vody ve spodní vrstvě půdy („transpirační pára“) a b) z vody na povrchu půdy („evaporační pára“). Pokud známe izotopové složení evaporační ( $\delta_E$ ) a transpirační ( $\delta_T$ ) páry, změříme izotopové složení vodní páry ve volné atmosféře  $\delta_{ET}$ , která vznikla jejich smícháním a známe velikost evapotranspiračního toku  $ET$ , můžeme snadno dopočítat velikost toků  $E$  a  $T$ . Odvození vztahu pro rozdělení evapotranspiračního toku je pro zájemce uvedeno v následujícím oddílu. Podrobnější popis metody uvádí např. Wang a Yakir (2000).

---

*Použití stabilních izotopů ke kvantifikaci jednotlivých složek evapotranspiračního toku*

*Evapotranspirace  $ET$ , tj. celkový tok vody ze suchozemského systému (např. porostu nebo ekosystému) má dva komponenty, výpar z povrchu půdy ( $E$ ) a transpiraci z rostlin ( $T$ ):*

$$ET = E + T \quad 7.5.1.1$$

*Všechny tyto toky vody mohou mít rozměr hustoty toku např. mol ( $H_2O$ )  $m^{-2}$  (plochy povrchu)  $s^{-1}$ . Pokud oba zdroje  $E$  a  $T$  mají jiné izotopové složení, označme je  $\delta_E$  a  $\delta_T$ , můžeme stejně, jako jsme vyjádřili bilanci toků veškeré vody v rovnici 7.5.1.1, popsat bilanci toků těžké vody ( $H_2^{18}O$ ), tzv. izotopovou hmotovou bilanci:*

$$ET \cdot \delta_{ET} = E \cdot \delta_E + T \cdot \delta_T \quad 7.5.1.2$$

---

<sup>21</sup> Jak uvidíme dále, voda v listu je velmi obohacená o těžké izotopy ale přesto vodní pára, která z listů vychází, má stejné izotopové složení jako hluboká půdní voda. To platí pouze za tzv. izotopově rovnovážného stavu, kdy se izotopové složení vody v listu s časem nemění. Má se za to, že po většinu fotoperiody právě takový stav v listech panuje.

Máme tak soustavu dvou rovnic, 7.5.1.1 a 7.5.1.2, o dvou neznámých ( $E$  a  $T$ ) z které snadno vyjádříme  $T$  nebo  $E$ :

$$T = f_T \cdot ET \quad a \quad E = f_E \cdot ET \quad 7.5.1.3a,b$$

kde  $f_T = (\delta_{ET} - \delta_E) / (\delta_T - \delta_E)$  a  $f_E = (\delta_T - \delta_{ET}) / (\delta_T - \delta_E)$  a poměr  $f_T/f_E = (\delta_{ET} - \delta_E) / (\delta_T - \delta_{ET}) = T/E$  je poměrem transpirace k evaporaci z povrchu půdy. Pokud tedy známe izotopová složení  $\delta_{ET}$ ,  $\delta_E$  a  $\delta_T$ , stačí nám pouze tato znalost k odhalení podílu vody, který opouští ekosystém výparem z povrchu půdy a transpirací z rostlin.  $\delta_{ET}$  zjistíme např. měřením izotopového složení vody získané kondenzací vodní páry z atmosféry nad porostem a/nebo výpočtem z tzv. Keelingova grafu,  $\delta_T$  se obvykle zjišťuje analýzou vody získané ze stonku (xylému) nebo z vrstev půdy, kde jsou kořeny a  $\delta_E$  lze spočítat na základě tzv. Craig-Gordonova vztahu z izotopového složení vody ve vrchní vrstvě půdy, vlhkosti a izotopového složení vody v atmosféře – viz dále.

### 7.5.2. Izotopové ochuzení vypařené vody (Craig-Gordonův vztah)

Vodní pára v atmosféře nebo voda v transpiračním proudu ve stoncích (xylému) jsou relativně přístupné izotopové analýze a stačí je extrahovat ze vzduchu nebo stonku např. kondenzací při nízké teplotě, tzv. kryodestilací<sup>22</sup> a analyzovat pomocí IRMS. Větší problém představuje stanovení izotopového složení páry, která vznikla po výparu z volné hladiny vody nebo z povrchu půdy,  $\delta_E$ . To je důležitý parametr nejen pro výše uvedenou separaci transpiračního a evaporačního toku v evapotranspiraci ekosystémů a krajiny.  $\delta_E$  je velmi významná veličina z hydrologického hlediska globální bilance vody. Izotopový „punc“  $\delta_E$  nese totiž také všechna voda, která se vypaří z oceánů. My už víme, že voda vypařená z oceánů bude ochuzená o těžké izotopy ve srovnání se zdrojovou vodou v důsledku rovnovážné frakcionace při výparu a kinetické při transportu (difusi). Nevíme ale ještě, jak mnoho, o kolik promile. V následujícím textu vysvětlíme, jak hodnotu  $\delta_E$  stanovit.

Dnes už ověřený vztah našli a zveřejnili v roce 1965 Craig a Gordon a je jej možné zapsat v jedné z následujících podob:

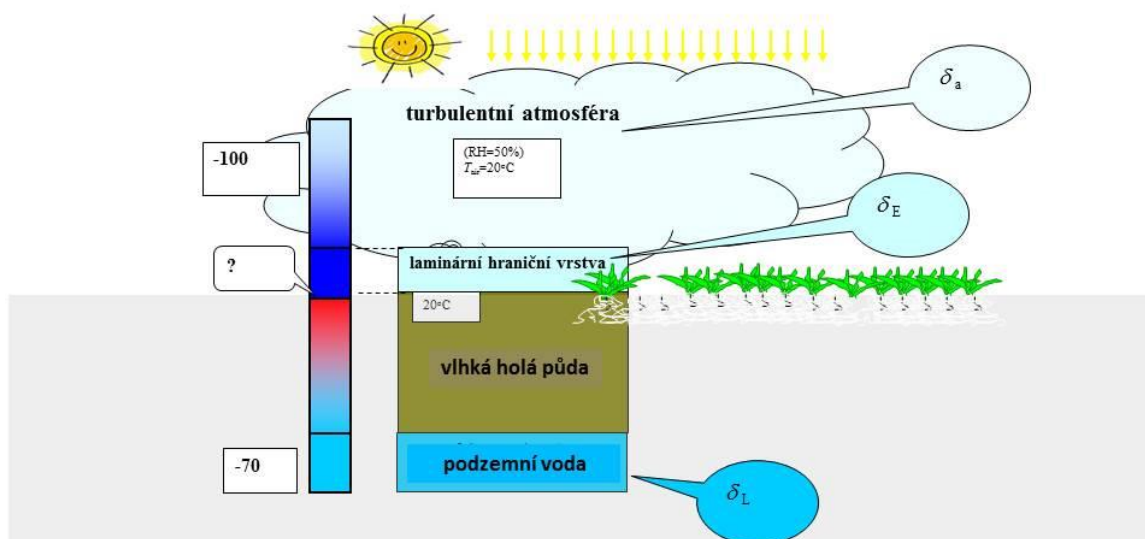
$$\delta_E = \frac{\alpha^* \cdot \delta_L - h \cdot \delta_a - \varepsilon^* - (1-h) \cdot \varepsilon_k}{(1-h) + (1-h) \cdot \varepsilon_k / 1000} \quad 7.5.2.1a$$

$$\delta_E \cong \frac{\delta_L - h \cdot \delta_a - \varepsilon^* - (1-h) \cdot \varepsilon_k}{(1-h)} \quad 7.5.2.1b$$

Obě formy vedou k podobnému (ne totožnému) výsledku; druhá podoba (7.5.2.1b) je zjednodušením předchozí verze (7.5.2.1a).  $\alpha^*$  je rovnovážný izotopový efekt, který je možné vyjádřit také prostřednictvím frakcionačního faktoru  $\varepsilon^*$  jako  $\varepsilon^* = (1 - \alpha^*) \cdot 1000$  ‰. Podobně  $\varepsilon_k$  je kinetický frakcionační faktor. Jejich hodnoty jsou uvedeny v kapitole 7.2. Symbol  $h$  reprezentuje relativní vlhkost vzduchu ve škále 0-1 při teplotě výparného povrchu (půdy nebo kapaliny). Indexy  $E$ ,  $L$  a  $a$  u  $\delta$  [‰] říkají, že jde o vodní páru ve

<sup>22</sup> Pro metodu bez použití vakua viz např. Šantrůček *et al.* 2007, vakuové metody např. Peters a Yakir 2008, Koeniger *et al.* 2011.

vzduchu na rozhraní hraniční vrstvy a volné turbulentní atmosféry,  $\delta_E$ , o kapalnou vodu,  $\delta_L$ , nebo o vodní páru ve vzduchu,  $\delta_a$  (viz obr. 7.5.2.1).

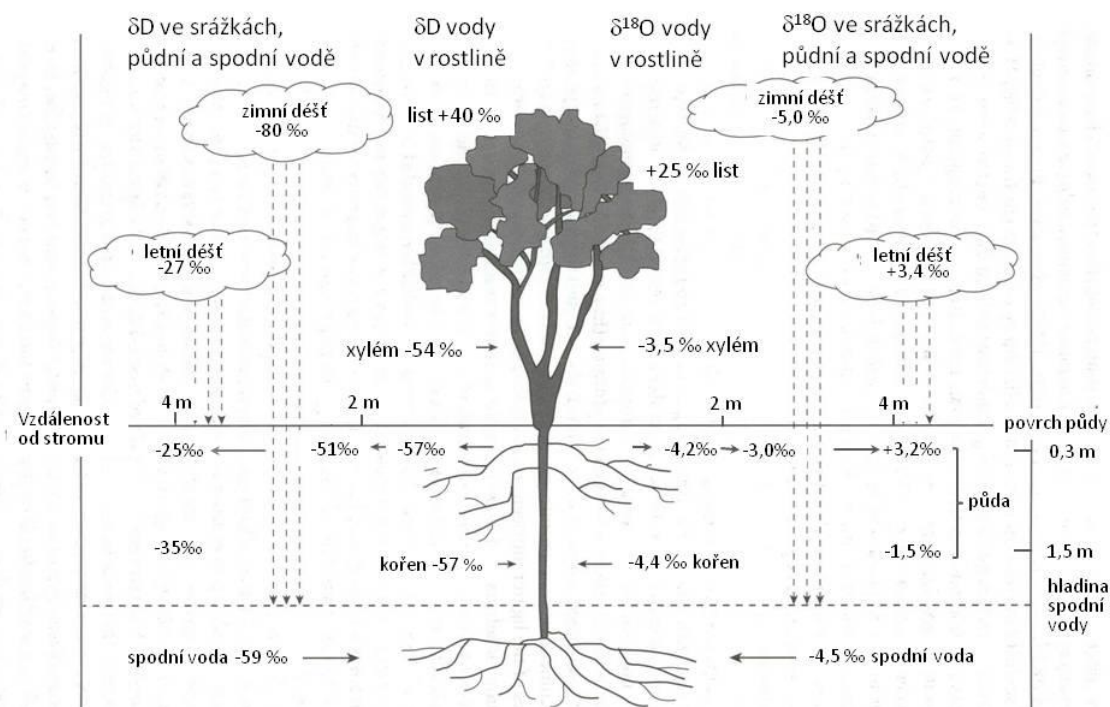


Obr. 7.5.2.1 Schéma profilu půdy a atmosféry s vyznačením veličin a některých hodnot izotopového složení vody. Atmosféra je rozlišena na laminární hraniční vrstvu přiléhající k povrchu půdy a na turbulentně míchanou atmosféru, půda pak na zvodněnou vrstvu (podzemní voda) a vlhkou povrchovou vrstvu bez pokryvu (holá půda). Příklady hodnot  $\delta D$  izotopového složení spodní vody a vody v turbulentní atmosféře jsou uvedeny v boxech vlevo. Craig-Gordonův vztah hledá hodnoty izotopového složení vody vypařené z holé půdy a opouštějící hraniční vrstvu vzduchu nad ní,  $\delta_E$ .

Craig-Gordonova rovnice přinesla kvantitativní porozumění frakcionace vody v hydrologii. Přispěla ale také k pochopení toho, proč a jak hodně je voda na konci své transportní dráhy rostlinami (na výparných místech v listech) obohacena o těžší izotopy a jakými faktory prostředí je toto obohacení ovlivňováno. Protože, jak už bylo zmíněno, je voda v listech výchozím donorem kyslíku a vodíku při fotosyntéze a v mnoha metabolických reakcích, nese izotopový signál odvozený od této vody také např. celulóza ale i kyslík, který je jako plyn  $O_2$  uvolňován při fotolýze vody ve fotosyntéze. Proto se izotopové obohacení listové vody promítá v izotopovém složení atmosférického kyslíku Země nebo mohou izotopové analýzy paleozbytků kmenů dřevin vypovídat o teplotě nebo vlhkosti ovzduší v minulých geologických dobách.

### 7.5.3. Izotopové složení vody v rostlině a v půdě v jejím okolí

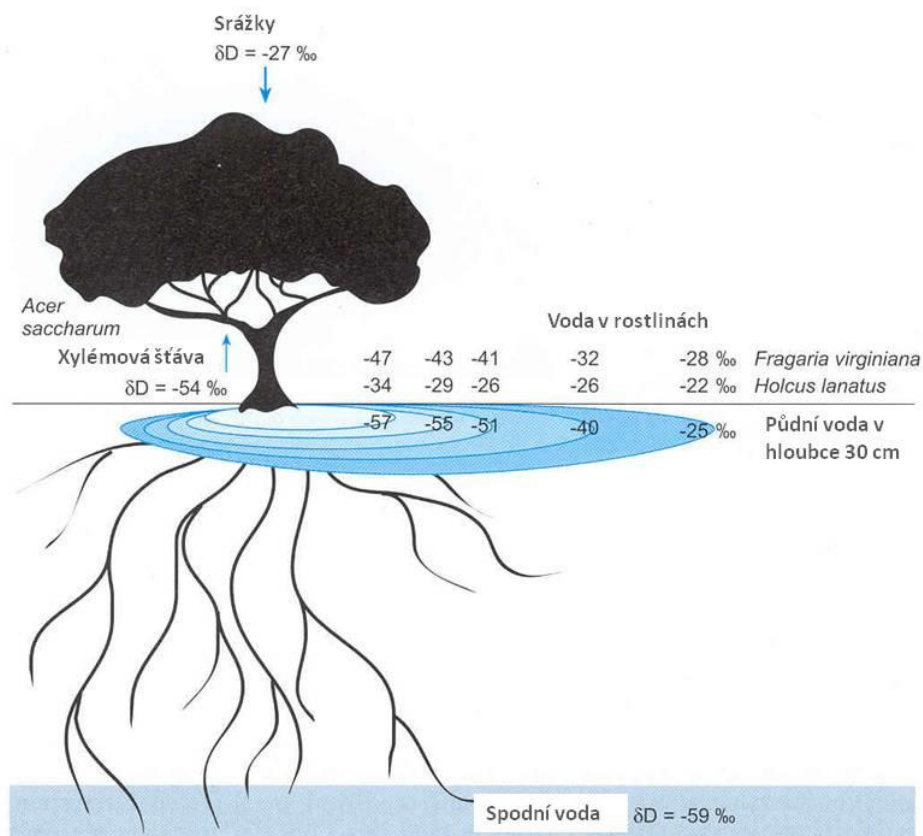
Budeme-li analyzovat vodu získanou z kořenů nebo stonků, zjistíme, že je izotopově blízká zdroji tj. vodě v půdě, kde jsou kořeny. Z toho plyne empirické zjištění, že během příjmu a transportu vody v těle rostliny (v xylémových cévách) nedochází k frakcionaci. Proto i voda získaná např. z drobných větviček nebo i řapíku listu by měla být izotopově téměř identická s vodou v půdě, pokud během transportu nedocházelo k většímu výparu (např. přes povrch stonků) nebo k míchání xylémové vody s izotopově jiným zdrojem (např. floémovou vodou). Pokud ale analyzujeme vodu extrahovanou z listů, zjistíme, že je většinou podstatně obohacená ve srovnání s vodou ze stonků. Příklad izotopového složení vody v rostlině (stromu) a v půdě v jeho okolí je na obrázku 7.5.3.1.



Obr. 7.5.3.1 Typický příklad izotopového složení vody v modelovém stromu, jehož kořeny dosáhnou na spodní vodu, a v půdě v jeho okolí. Obsah deuteria (levá polovina obrázku od osy stromu) a  $^{18}O$  (pravá polovina) se mění ve srážkách podle ročního období. Spodní voda má složení bližší zimním srážkám, protože ty jsou jejím hlavním zdrojem (letní srážky se více vypaří, než se vsáknou do půdy). Voda v xylémových cévách má složení blízké spodní vodě, kterou strom hlavně přijímá, ale během výparu uvnitř listů se voda velmi obohacuje o těžší izotopy D a  $^{18}O$ , protože se snáze vypařuje lehčí voda a těžší zůstává v listech. Voda v povrchových vrstvách půdy (0,3 m) je ve větší vzdálenosti od kmene stromu izotopově podobná srážkové vodě (v létě blízká letnímu dešti), při přibližování ke stromu se izotopové složení vody v půdě může blížit spodní vodě, pokud jí kořeny čerpají (viz jev nazývaný „hydraulický výtah“ a popsany dále). V hlubších vrstvách půdy je voda izotopově mezi letními srážkami a spodní vodou v důsledku částečného zasakování letního deště a vztlínání spodní vody. Obrázek upraven podle Griffith *et al.* (1998).

Analýzy izotopového složení vody v kmeni nebo ve stoncích rostlin mohou spolehlivě odhalit, odkud stromy čerpají vodu. Rostliny pobřežních společenstev, např. stromy rostoucí na březích řek mohou být zásobovány vodou z řeky, podzemní vodou nebo srážkovou vodou z povrchových vrstev půdy. Voda v řekách má obvykle odlišné izotopové složení od dvou ostatních zdrojů, protože se řeka plní odtékajícími srážkami z horských oblastí. Dawson a Ehleringer (1991) takto například odhalili překvapivou skutečnost, že dospělé stromy rostoucí blízko řeky využívají jen velmi málo nebo vůbec žádnou říční vodu.

Podobné překvapení čekalo na biology analyzující obsah deuteria ve vodě v podpovrchových vrstvách půdy v transektu několika metrů od kmene javoru cukrového (*Acer saccharum*). Princip jejich sledování je na obrázku 7.5.3.2. Spodní voda byla výrazně odlišná od srážek, což prozradila analýza vody z větví stromu. Ve větší vzdálenosti od kmene výrazně mimo obvod koruny měla půdní voda izotopové složení blízké srážkové vodě. Ve vzorcích vody z půdy odebraných blíž a blíž patě kmene se stávala voda ochuzenější, až dosáhl obsah deuteria hodnot blízkých  $\delta D$  spodní vody. Podobně se chovala voda izolovaná z povrchově (tráva medyněk - *Holcus lanatus*) nebo hlouběji (jahodník - *Fragaria virginiana*) kořenících bylin. Vysoce pravděpodobným vysvětlením pro tento jev je to, že strom čerpá spodní vodu hluboko pod povrchem, vede ji kořeny k povrchu a zde ji opět vylučuje do půdy (Dawson 1993). Toto chování bylo později potvrzeno pro mnoho dalších druhů stromů a bylin, a dostalo pojmenování hydraulický výtah (*hydraulic lift*). Dnes se častěji označuje jako hydraulická redistribuce vody v půdě.



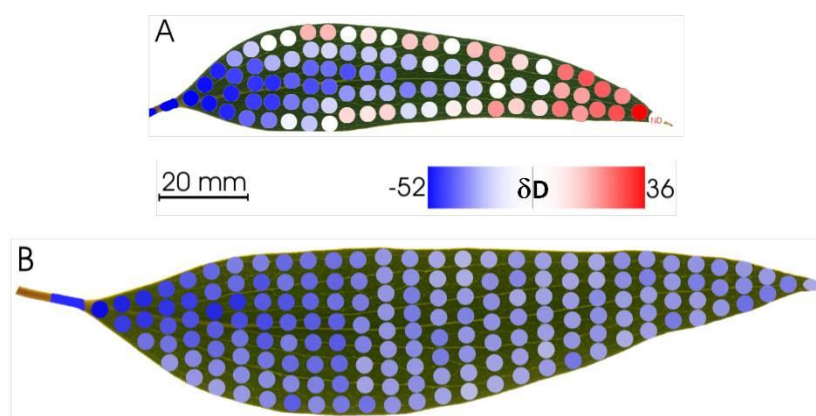


Obr. 7.5.3.2. Znázornění jevu nazývaného hydraulický výtah (hydraulická redistribuce) vody tak, jak byl prvně pozorován a publikován Dawsonem (1993). Detaily jsou uvedeny v textu.

Hydraulický výtah je pravděpodobně univerzální jev a vyplývá z toho, že kořeny rostlin nejsou zcela „těsné“ a dovolují úniku vody přes vnitřní bariéry v kořeni (endodermis) ven do relativně suché půdy v jejich okolí. Přesto má pravděpodobně význam např. pro příjem živin z vrchních na živiny bohatých vrstev půdy v periodách sucha. Vodu strom „čerpá“ a uvolňuje do půdy např. během noci, kdy je její spotřeba stromem malá (průduchy jsou v noci zavřené a transpirace nízká). Během dne ji mohou přijímat spolu s rozpuštěnými živinami kořeny, které má strom těsně pod povrchem půdy. Je možné, že hydraulický výtah má také pozitivní vliv na vývoj semenáčků v podrostu dospělého stromu.

#### **7.5.4. Izotopové složení vody v listech rostlin**

Jak vyplývá z obrázku 7.5.3.1 a z četných pozorování, voda v listech bývá velmi obohacená proti zdrojové vodě, která proudí do listů cévami xylému ve stonku (kmeni) a v řapíku listů. Tento fakt má velké důsledky v izotopovém složení kyslíku a vodíku v organických látkách syntetizovaných v rostlinách, a proto je také zájem znát zákonitosti, jakými se izotopové obohacení vody v listech řídí. Obohacení listové vody vzniká v momentě, kdy se voda začne z listu vypařovat (např. proto, že se při východu slunce otevřou průduchy a vzduch kolem listu není nasycen vodní parou). Víme už, že se snáze vypařuje izotopově lehká voda než těžší, a proto se těžší izotopy hromadí uvnitř listu a jejich koncentrace na místech výparu stoupá. Nestoupá ale do nekonečna. Po chvíli při určité vyšší koncentraci těžké vody dojde k tomu, že těžší izotopy začnou difundovat po koncentračním spádu zpět proti hromadnému (konvektivnímu) toku vody, která přitéká do listu (tj. proti transpiračnímu proudu) a jejich koncentrace v listu přestane stoupat. Takovému stavu říkáme izotopová rovnováha a je charakteristická tím, že voda přitékající do listu a voda vypařující se z listu mají stejné izotopové složení. Ustavení izotopové rovnováhy je rychlé, protože listem proteče za jednu hodinu až trojnásobné množství vody v poměru k jeho objemu (přesněji k množství v listu obsažené vody). Sériové uspořádání výparných míst a interakce hromadného (konvektivního) toku vody do míst výparu a difuzního toku těžkých molekul proti směru hromadného toku vody vede k tomu, že se voda v listu směrem od báze (od řapíku) ke špičce listu obohacuje. Příklad tohoto jevu můžeme vidět na obrázku 7.5.4.1.



Obr. 7.5.4.1. Heterogenita přirozeného obsahu izotopologu  $^2\text{H}^1\text{HO}$  vody ( $\delta\text{D}$ ) ve vodě izolované ze segmentů listu blahočetu (*Eucalyptus pauciflora*). Semenačky blahočetu byly pěstovány dva roky ve skleníkových kójičích při dvou různých relativních vlhkostech vzduchu, 20-50 % (list A) a 40-80 % (list B), stejné teplotě a ozáření a v obou kójičích zalévány vodou o stejném izotopovém složení (kohoutková voda). Listy rostlin ze suchého prostředí byly menší než u rostlin z vlhka. Listy byly během dopoledne odstřiženy, vyseknuty z nich korkovrtem terčíky o průměru 4 mm v označených místech, z každého terčíku izolována voda a analyzována na obsah deuteria. Detaily uvedeny v Šantrůček *et al.* 2007.

Z obrázku je vidět, že voda v listech se obohacuje od báze ke špičce listu a od středu k okrajům čepele. Progresivní obohacení o těžké izotopy směrem ke špičce je zřetelné u rostlin pěstovaných v suchém prostředí (7.5.4.1A). V daleko menší míře je obohacení patrné u rostlin rostoucích ve vlhkém klimatu (7.5.4.1B), které mají nižší rychlost transpirace. Obohacení vody podél listu je analogické izotopovému obohacení vody po toku řeky, která stéká z hor, protéká aridní oblastí s velkým výparem, který snižuje množství vody v řece, až řeka vysychá zcela a končí kdesi v písku pouště případně v dočasném jezeru. Proto se tento typ obohacení vody v listu nazývá „efekt pouštní řeky“.

Matematické modely heterogenního izotopového obohacení listové vody jsou poměrně složité zvláště pro dvouděložné rostliny s retikulární dlanitě větvenou žilnatinou. Jako parametry v nich vystupují anatomické vlastnosti transportní dráhy vody v listu a rychlost transpirace zahrnuté do tzv. Pécletova čísla, které charakterizuje interakci hromadného toku vody transpiračním proudem a protisměrného difuzního toku těžších molekul vody. Přesto byl a je zájem na tom mít alespoň relativně spolehlivý odhad průměrného obohacení vody v listu v závislosti na faktorech prostředí, hlavně vlhkosti a teplotě, na kterých je obohacení závislé především. První exaktní předpovědi izotopového obohacení vody v listu formuloval Dongmann v roce 1974. Předpokládalo se, že list je izotopově uniformní a dobře míchaná vodní „nádž“ v izotopově rovnovážném stavu. Proto se izotopové složení vody na vstupu do listu (např. zálivkové vody),  $\delta_s$ , a vody vypařené (vytranspiované z listu),  $\delta_E$ , považuje za stejné ( $\delta_E = \delta_s$ ). Nahrazením  $\delta_E$  v Craig-Gordonově vztahu (rovnice 7.5.2.1a) veličinou  $\delta_s$  a řešením pro kapalnou vodu  $\delta_L$ , jež

tady nahradíme symbolem  $\delta_{ss}$  ( ss jako zkratka pro izotopově rovnovážný stav, *steady state*), dostaneme výraz:

$$\delta_{ss} = \delta_s + \varepsilon^* + \varepsilon_k + h \cdot (\delta_a - \varepsilon_k - \delta_s)$$

který můžeme ještě zjednodušit, pokud si uvědomíme, že rozdíl  $\delta_{ss}-\delta_s$  je obohacení vody v listu proti zdrojové (do listu vstupující) vodě,  $\Delta_L$ , a rozdíl  $\delta_a-\delta_s$  představuje změnu v izotopovém složení vodní páry v atmosféře v okolí listu proti zdroji vody pro list,  $\Delta_a$ . Pak obohacení vody v listu proti zdroji můžeme vyjádřit jako:

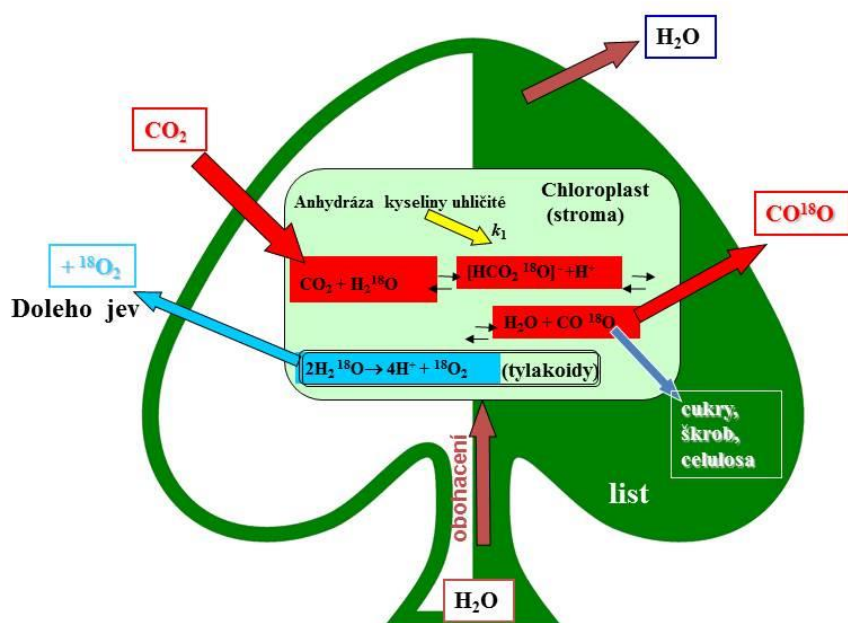
$$\Delta_L = \varepsilon^* + \varepsilon_k + h \cdot (\Delta_a - \varepsilon_k) \quad 7.5.4.1b$$

Symbol  $h$ , který v Craig-Gordonově vztahu znamenal relativní vlhkost vzduchu při teplotě povrchu kapaliny (nebo vlhké půdy) zde také je relativní vlhkost okolního vzduchu (ve škále 0-1) ale při teplotě listu. To, že výraz 7.5.4.1b má smysl a bude dávat odpovídající výsledky, můžeme ověřit jednoduchou úvahou: Protože ochuzení atmosféry proti zdrojové vodě v půdě,  $\Delta_a$ , bývá číselně podobně ale znaménkem opačné rovnovážnému frakcionačnímu faktoru  $\varepsilon^*$ , vede k tomu, že pro  $h=1$ , tedy vzduch nasycený vodní parou, nebude voda v listu proti zdroji obohacena vůbec, tedy  $\Delta_L=0$ . Naopak, pro zcela suchý vzduch, jehož  $h=0$ , bude obohacení maximální,  $\Delta_L = \varepsilon^* + \varepsilon_k$ . Hodnota  $h$  ovšem závisí nejen na obsahu vody ve vzduchu ale také na teplotě listu. S vyšší teplotou listu se bude  $h$  snižovat i při neměnné vlhkosti vzduchu, protože s rostoucí teplotou „se vejde“ do vzduchu více vodní páry. Proto budou listy exponované přímému slunci, a tedy mající vyšší teplotu, mít obohacnější vodu než listy ve stínu, i když obě skupiny rostou ve stejné a tedy stejně vlhké atmosféře. Míra obohacení listové vody nás proto může informovat i o teplotě listu. A protože teplota listu je do velké míry ovlivněna také ochlazováním listu v důsledku spotřeby latentního tepla na výpar vody a tedy rychlostí transpirace, obohacení listové vody  $\Delta_L$  nepřímo informuje také o otevřenosti průduchů (průduchové vodivosti pro difuzi vodní páry). Zbývá dodat, že obohacení listové vody vypočítané z rovnice 7.5.4.1b bývá obvykle o něco vyšší, než je skutečnost zjištěná přímo izotopovou analýzou vody extrahované z listu. Důvod je pravděpodobně v už zmíněné prostorové heterogenitě izotopového složení vody a s tím souvisejícím efektem pouštní řeky (obr. 7.5.4.1).

## 7.6 Otisk izotopového složení vody v organických látkách v rostlinách a živočiších

Primární produkce organických látek na Zeměkouli je doménou rostlin; asi z jedné poloviny suchozemských rostlin a z druhé mořských a vodních autotrofních řas a sinic. Všechny metabolické procesy se přitom odehrávají ve vodním prostředí. Z toho bychom mohli očekávat, že kyslík z vody obsažené v buňkách bude základem kyslíku ve všem živém. Uvědomme si ale, že zdrojem uhlíku pro rostliny je oxid uhličitý z atmosféry, jehož molekuly se zabudovávají celé včetně atomů kyslíku do organických látek při fotosyntéze. Dále, rostliny i živočichové dýchají a při tom přijímají molekulární kyslík z atmosféry. Odkud tedy pochází atomy kyslíku v rostlinách nebo v našem těle? Otázku původu kyslíku v celulóze rostlin se pokoušeli na základě jednoduchých experimentů zodpovědět už DeNiro a Epstein (1979). Dospěli k závěru, že kyslík pochází z  $\text{CO}_2$ , jak se očekávalo ze znalosti karboxylačních reakcí, ale zároveň, že před tím, než ke karboxylaci v chloroplastech došlo, si vyměnil  $\text{CO}_2$  kyslíkové atomy s vodou během procesu hydratace  $\text{CO}_2$  neboli tvorby bikarbonátových aniontů ( $\text{HCO}_3^-$ ). K procesu hydratace

rozpuštěného  $\text{CO}_2$  dochází v buňkách spontánně, ale tento proces je ještě urychlován enzymem anhydrázou kyseliny uhličitě (angl. *carbonic anhydrase*). Buňka listového mezofylu a zvláště chloroplast se tak stávají křižovatkou, na které se setkávají  $\text{CO}_2$  a voda a vyměňují si zde kyslíkové atomy prostřednictvím  $\text{OH}^-$  iontů. Proto, jak ukázala zmíněná pionýrská práce DeNira a Epsteina, je hodnota  $\delta^{18}\text{O}$  cukrů a z nich syntetizované celulózy rostlin blízká s hodnotou  $\delta^{18}\text{O}$  vody v listu. Známe-li proto mechanismy obohacení vody v listu, sumarizované v rovnici 7.5.4.1b, můžeme ze zastoupení izotopů kyslíku v celulóze usuzovat na podmínky, ve kterých rostlina rostla. Mechanismus přenosu izotopového signálu kyslíku z vody v listu do organických látek a důsledky izotopového obohacení listové vody pro izotopové složení kyslíku a oxidu uhličitého v atmosféře Země jsou schematicky ukázány na obr. 7.6.1.



Obr. 7.6.1 Schéma přenosu izotopu  $^{18}\text{O}$  z vody do organických látek prostřednictvím molekul  $\text{CO}_2$  a některé důsledky izotopového obohacení vody v listu. Voda, která proudí do listu řápkem se v procesu výparu (karmínová barva) obohacuje o  $^{18}\text{O}$  a disociované  $^{18}\text{OH}^-$  ionty se váží na molekuly  $\text{CO}_2$  přicházejícího z atmosféry a rozpuštěného v buňkách a ve stromatu chloroplastů (jasně červená). Tento proces vzniku obohacených bikarbonátových iontů ( $[\text{HCO}_2^{18}\text{O}]^-$ ) je katalyzován anhydrázou kyseliny uhličitě (žlutá), je velmi rychlý, probíhá při velikém nadbytku vody ve srovnání s  $\text{CO}_2$  a je vratný. Proto dojde konec konců (v rovnovážném stavu) k záměně obou atomů kyslíku v  $\text{CO}_2$  za atomy kyslíku z vody a  $^{18}\text{O}$  obohacení vody se tak „otiskne“ do obohacení  $\text{CO}_2$ . Obohacený  $\text{CO}_2$  je pak substrátem pro fotosyntetickou karboxylaci a základem pro tvorbu cukrů, škrobu a celulózy, nejběžnějšího polysacharidu v rostlinách (bílá). Protože cukry jsou také substrátem pro dýchání, vydýchaný  $\text{CO}_2$  (jasně červená) je rovněž obohacený o  $^{18}\text{O}$  ve srovnání s atmosférickým  $\text{CO}_2$  a může tak být indikátorem aktivity suchozemské vegetace v globálním měřítku. Podobně, v procesu fotolytického štěpení vody (modrá), ke kterému dochází na světle v bílkovinných komplexech thylakoidních membrán a během kterého se uvolňuje molekulární kyslík, se štěpí

obohacená listová voda, a proto je  $O_2$  také obohacen o  $^{18}O$ . To je jedna z příčin, proč je kyslík v atmosféře Země obohacen o izotop  $^{18}O$  ve srovnání s vodou v oceánech. Tomuto jevu se říká podle jeho objevitele Doleho jev (angl. *Dole effect*).

Je třeba ještě zmínit, že výměna  $^{18}O$  atomů mezi  $CO_2$  a  $H_2O$  prostřednictvím  $OH^-$  iontů není jediná forma, jak se obohacený kyslík z vody dostává do organických látek. Obecně atomy kyslíku, které jsou vázány v karbonylové skupině ( $C=O$ ) se ochotně vyměňují a dochází tak k dalšímu obohacení organických látek až poté co byly syntetizovány (tzv. postfotosyntetické obohacení). Při výměně karbonylového kyslíku dochází k obohacení organické látky oproti vodnému prostředí o asi 27 ‰. Např. smíchání acetonu (s jedním vyměnitelným karbonylovým kyslíkem) s vodou vedlo k jeho obohacení o 28 ‰ (Sternberg, DeNiro 1983), nebo sacharóza exportovaná z listů byla obohacená o 27 ‰ oproti vodě v listu (Cernusak 2003).

Znalost frakcionace izotopů vody v listech, potažmo v organických látkách syntetizovaných v listech, přináší celou řadu potenciálních i už vyzkoušených aplikací. Některé už jsme naznačili. Např. integrativní měření vodivosti průduchů a možnost detailnější interpretace výsledků z měření  $\delta^{13}C$ ; chronologické sledování změn podmínek prostředí (teploty a vlhkosti vzduchu) během sezóny např. z analýz listů trav (trávy jak známo přirůstají od báze listu, takže špička je nejstarší), (Heliker a Ehleringer 2002); studium toků vody v ekosystému (např. Wang a Yakir, 2000), rekonstrukce obsahu  $^{18}O$  v atmosférické vodě (a z něho teploty vzduchu) z analýz biomasy CAM rostlin (Helliker a Griffith 2007).

Samostatný oddíl by mohly představovat aplikace věnované rekonstrukci novějšího nebo vzdáleného paleoklimatu a podmínek prostředí na základě izotopových analýz  $^{18}O$  a/nebo  $^{13}C$  rostlinných nebo živočišných „archivů“ organických látek, např. celulózy v letokruzích stovky ale i několik tisíc let starých stromů nebo jejich paleozbytků (např. Šantrůčková *et al.* 2007), nebo např. guána netopýrů (např. Wurster *et al.* 2007). Podobné izotopové analýzy  $^{18}O$  a D pro určení původu a pravosti rostlinných a živočišných tkání.

## 7.7. Shrnutí

Nejbohatším zásobníkem vody na Zemi je oceán. Z devíti možných izotopových podob (izotopologů) vody je v něm nejčastěji zastoupena  $^1H_2^{16}O$ , jen přibližně 0,2 ‰ oceánské vody představuje  $^1H_2^{18}O$  a 0,05 ‰ voda s deuteriem ( $^2H^1H^{16}O$ ). Relativní zastoupení obou minoritních izotopově těžších forem vody se mění v průběhu hydrologického cyklu. Při výparu a transportu se těžší izotopy vody diskriminují, při kondenzaci (např. v mracích) přecházejí do kapalné fáze preferenčně. Tato izotopová frakcionace je výrazně teplotně závislá. Proto pozorujeme kontinentální, efekt, účinek nadmořské výšky, zeměpisné šířky a množství na izotopové složení srážek. Geograficky specifické izotopové složení se vyjadřuje pomocí izotopových map. Obecně ve vyšších zeměpisných šířkách, nadmořských výškách a dále od oceánu jsou srážky ochuzené o těžší izotopy kyslíku a vodíku ve vztahu daném globální meteorickou vodní přímkou (GMVL). Její sklon je určen poměrem rovnovážných frakcionačních faktorů pro kyslíkové a vodíkové izotopy vody, který se blíží číslu 8. Voda, jejíž izotopové složení neleží na GMVL byla vystavena výparu; naopak dešťová voda nebo podzemní voda musí svým izotopovým složením „padnout“ na GMVL.

Voda v povrchových vrstvách půdy je izotopově obohacená oproti podzemní vodě. Obohacení vzrůstá od hloubky cca 0,5-0,3 m směrem k povrchu a je projevem ochuzení vodní páry při jejím výparu z povrchu půdy. Rostliny (stromy) přijímají hlubší půdní nebo podzemní vodu, která rostlinou „protéká“ bez frakcionace a transpirovaná vodní pára tak má stejné izotopové složení jako voda v půdě, kde jsou kořeny. Rozdíl v izotopovém složení transpirační vody a vody vypařené z povrchu půdy je základem metody pro zjištění podílu transpirace a evaporace.

Voda v listech rostlin je silně obohacená proti zdrojově vodě (vodě v xylémových cévách vedené z kořenů do listů). Obohacení vody v listech je časově i prostorově heterogenní. Lze je vypočítat pomocí upraveného Craig-Gordonova vztahu, pokud známe vlhkost okolního vzduchu, teplotu listu a izotopová složení vzdušné vlhkosti a zdrojové vody. Kyslík  $^{18}\text{O}$  z obohacené vody v listech se v buňkách vyměňuje s kyslíkem v  $\text{CO}_2$  a je tak při fotosyntetické karboxylaci zabudován do organických látek např. strukturního polysacharidu celulózy. Chronologické ukládání celulózy do letokruhů u druhotně tloustnoucích rostlin tak umožňuje detegovat atmosférické podmínky a jevy v nedávné nebo i vzdálené minulosti.

## 7.8 Seznam použité literatury

- BOWEN G.J., CERLING T.E., EHLERINGER J.R. (2007) Stable isotopes and human water resources: Signals of change. In: DAWSON T.E., SIEGWOLF R.T.W. (ed.) *Stable Isotopes as Indicators of Ecological Change*. Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg. Pp.285-300.
- CERNUSAK L.A., ARTHUR D.J., PATE J.S., FARQUHAR G.D. (2003) Water relations link carbon and oxygen isotope discrimination to phloem sap sugar concentration in *Eucalyptus globulus*. *Plant Physiology* **131**, 1544-1554.
- COPLAN T.B. HOPPLE J.A., BÖHLKE J.K. ET AL. (2002) Compilation of minimum and maximum isotope ratios of selected elements in naturally occurring terrestrial materials and reagents. US Geological Survey, Reston, Virginia.
- Dawson T.E. (1993) Hydraulic lift and water-use by plants. Implications for water balance, performance and plant-plant interactions. *Oecologia* **95**, 565-574.
- Dawson T.E., Ehleringer J.R. (1991) Streamside trees that do not use stream water. *Nature* **350**, 335-337.
- DENIRO M.J., EPSTEIN S. (1979) Relationship between the oxygen isotope ratios of terrestrial plant cellulose, carbon dioxide, and water. *Science* **204**, 51-53.
- GRIFFITHS H., BORLAND A., GILLON J., HARWOOD K., MAXWELL K., WILSON J. (1999) Stable isotopes reveal exchanges between soil, plants and the atmosphere. In: Press M.C., Scholes J., Barker M.G. (ed.) *Physiological Plant Ecology*. Blackwell Science, Pp.415-441.
- HELLIKER B.R., EHLERINGER J.R. (2002) Grass blades as tree rings: environmentally induced changes in the oxygen isotope ratio of cellulose along the length of grass blades. *New Phytologist* **155**, 417-424.
- HELLIKER B.R., GRIFFITHS H. (2007) Toward a plant-based proxy for the isotope ratio of atmospheric water vapor. *Global Change Biology* **13**, 723-733.
- MORA C.I., MILLER D.L., GRISSINO-MAYER H.D. (2007) Oxygen isotope proxies in Tree-Ring cellulose: Tropical cyclones, drought, and climate oscillations. In: DAWSON T.E., SIEGWOLF R.T.W. (ed.) *Stable Isotopes as Indicators of Ecological Change*. Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg. Pp.285-300.
- PETERS L.I., YAKIR D. (2008) A direct and rapid leaf water extraction method for isotopic analysis. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **22**, 2929-2936.

- KOENINGER, P., MARSHALL J.D., LINK T., MULCH A. (2011) An inexpensive, fast, and reliable method for vacuum extraction of soil and plant water for stable isotope analyses by mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **25**, 3041-3048.
- ŠANTRŮČEK J., KVĚTOŇ J., ŠETLÍK J., BULÍČKOVÁ L. (2007) Spatial variation of deuterium enrichment in bulk water of *Eucalyptus pauciflora* leaves. *Plant Physiology* **143**, 88-97.
- ŠANTRŮČKOVÁ H., ŠANTRŮČEK J., ŠETLÍK J., SVOBODA M., KOPÁČEK J. (2007) Carbon isotopes in tree rings of Norway spruce exposed to atmospheric pollution. *Environmental Science & Technology* **41**, 5778-5782.
- STERNBERG L.D.L.O., DENIRO M.J.D. (1983) Biogeochemical implication of the isotopic equilibrium fractionation factor between the oxygen atoms of acetone and water. *Geochemica et Cosmochemica Acta* **47**, 2271-2274.
- VRABEC M. (2011) Oběh vody na Zemi. In: KLECZEK J. (ed.) Voda ve vesmíru, na zemi, v životě a v kultuře. Radioservis, Praha. Pp. 87-97.
- WANG X-F, YAKIR D. (2000) Using stable isotopes of water in evapotranspiration studies. *Hydrological Processes* **14**, 1407-1421.
- WURSTER C.M., MCFARLANE D.A., BIRD M.I. (2007) Spatial and temporal expression of vegetation and atmospheric variability from stable carbon and nitrogen isotope analysis of bat guano in the southern United States. *Geochemica et Cosmochemica Acta* **71**, 3302-3310.