# STANOVENÍ INTENZITY RESPIRACE Z MNOŽSTVÍ VYDÝCHANÉHO OXIDU UHLIČITÉHO

## OBECNÁ CHARAKTERISTIKA DÝCHÁNÍ

**Dýchání (respirace)** je základním metabolickým pochodem živých organismů. Dochází při něm k chemické přeměně rezervních sacharidů a tuků v energii makroergních chemických vazeb. Je to soubor procesů, kterými rostliny zajišťují využití asimilátů pro růst, udržení struktur a funkcí, transport látek a příjem iontů. Zřejmým projevem aerobního dýchání, které probíhá probíhá pouze za dostatečného přístupu kyslíku (viz. obecná rovnice) je tedy spotřeba substrátu a kyslíku, produkce oxidu uhličitého, vody a energie, včetně určitého podílu tepla:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \longrightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O + \text{energie}$$

Je to proces nezbytný i pro samotnou produktivitu rostliny (pro fotosyntézu). Vzhledem k tomu, že lze kvantitativně vyjádřit jaký podíl dýchání připadá na růst a vývoj nových struktur a jaký na stav, kdy rostlina neroste, rozlišujeme **dýchání růstové** a **dýchání udržovací**. Ikdyž se jedná v podstatě o jeden a tentýž biochemický komplex procesů, rozlišení spočívá pouze ve způsobu využití meziproduktů nebo energie uvolněné při dýchání.

## PRIMÁRNÍ SUBSTRÁTY AEROBNÍHO DÝCHÁNÍ ROSTLIN

Jako **substráty pro oxidaci** slouží v rostlinách ve většině případů sacharidy (glukóza, fruktóza), při nedostatku sacharidů to jsou organické kyseliny (jablečná, citrónová), eventuelně bílkoviny a tuky. Vlastní respirace však nezahrnuje přímou degradaci těchto látek, ale jejich metabolické přeměny - např. přeměny organických kyselin v Krebsově cyklu (citrátový cyklus). Slouží-li jako substrát pro dýchání tuky, tak nejprve jsou hydrolyzovány lipázou na glycerol a mastné kyseliny. Glycerol se pak oxiduje na glyceraldehyd-3-fosfát, který se účastní glykolýzy a mastné kyseliny se β-oxidací za účasti koenzymu A odbourávají, za vzniku acetylkoenzymu A, který je součástí Krebsova cyklu. U bílkovin obdobně nejprve dochází k hydrolýze na aminokyseliny a ty se pak oxidačně deaminují. Proto je celý proces komplexem mnoha biochemických a termodynamických jevů, jehož smyslem je přeměna energie a její zpřístupnění pro jiné procesy a tvorba jednoduchých organických sloučenin nutných nejen pro katabolické, ale i pro anabolické děje.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

## KOMPLEX PROCESŮ DÝCHÁNÍ

Celý komplex procesů dýchání lze rozčlenit do 4 souborů, které na sebe funkčně i prostorově navazují:

1, glykolýza - zahrnuje rozklad primárního substrátu na jednodušší molekuly s poměrně malým výtěžkem energie, dochází nejčatěji k přeměně molekuly hexózy na malát a pyruvát, proces je z větší části lokalizován v cytosolu.

2, Krebsův cyklus - tzv. citrátový cyklus, lokalizovaný v matrix mitochondrií. Energetická výtěžnost citrátového cyklu je vysoká, včetně tvorby $NADH_2$ a redukovaného flavoproteinu, uvolňuje se $CO_2$.

3, dýchací řetězec - je vlastním procesem umožnujícím biologickou oxidaci vodíku v následujících reakcích - oxidace redukovaných koenzymů NADH + $H^+$, $FADH_2$ - přenos elektronů z redukovaných koenzymů na kyslík, vzniká voda. Vlastní rekce probíhají na vnitřní mitochondriální membráně.

4, oxidativní fosforylace - při ní je volná energie přenosu elektronů v dýchacím řetězci spřažena se syntézou ATP.

## RESPIRAČNÍ KVOCIENT

Při respiraci dochází k výměně plynů opačného charakteru než při fotosyntéze. Je spotřebován kyslík a uvolňován oxid uhličitý. Poměr množství uvolněného $CO_2$ a spotřebovaného $O_2$ se nazývá respirační kvocient RQ. Pochází-li prodýchávaný substrát ze sacharidů tak RQ = 1, jsou-li prodýchávány tuky a bílkoviny (tj. vysoce redukované sloučeniny) RQ < 1, naopak při substrátech více oxidovaných (kyselina citronová) činí RQ hodnota 1,33.

$$RQ = \frac{\text{vyloučený } CO_2}{\text{spotřebovaný } O_2}$$

## VÝZNAM RESPIRACE PRO PRODUKTIVITU ROSTLIN

Průměrné denní ztráty biomasy způsobené udržovací složkou respirace dosahují hodnot kolem 2 % z celkové hmotnosti sušiny rostliny. Významný podíl na této skutečnosti nese obnova bílkovin v rostlinách, především v jejich mladých částech. Respirace růstová je pak významně zatížena příjmem iontů minerálních živin a to významněji u pomaleji rostoucích rostlin na minerálně chudých půdách - cca až 20 %

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

energie uvolněné respiračními procesy. Obdobně významný enrgetický podíl připadá na procesy spojené s aktivním transportem organických látek ve floému. Respirace tudíž vystupuje jako významný faktor uhlíkové bilance rostlin - složka, která snižuje **přírůstek biomasy rostlin** $\Delta W$. Přírůstek biomasy rostlin je rozdílem integrovaných hodnot hrubé fotosyntézy (F) a celkové respirace (R) za stejný časový interval.

$$\Delta W = F - R$$

## METODY STANOVENÍ RESPIRACE

Pro stanovení rychlosti respirace je požívána ředa metod manometrických (starší skupina metod - výdej a spotřeba plynů měřena manometricky), gazometrických (stanovení spotřeby kyslíku a produkce oxidu uhličitého), kalorimetricky (uvolňování tepla) a gravimetrických (úbytek hmotnosti sušiny). Mezi nejmodernější metody náleží některé fyzikálně-instrumentální metody, např. NMR (nukleární magnetická rezonance ve spojitosti se spektroskopií) - např. měření tvorby a rozkladu ATP *in vivo*.

## ACIDOBAZICKÁ TITRACE

Acidobazická titrace je metoda odměrné analýzy (kvantitativní metoda), při níž k vodnému roztoku látky, která se má stanovit přidáváme roztok odměrného činidla. Vlastní probíhající reakce je protolytická a probíhá mezi titrovanou (stanovovanou) látkou a titračním činidlem. Je-li titračním činidlem kyselina jde o **acidimetrii**, je-li to zásada, jde o **alkalimetrii**. Voda disociuje v malé míře, ale její proton je hydratován (hydroxoniový kation $H_3O^+$, také $H_9O_4^+$). Vodné prostředí pak vykazuje reakci pH („pondus hydrogeni“) dle množství těchto iontů jako kyselou, neutrální či zásaditou dle vztahu:

$$\mathbf{pH = - \log\ c\ (H_3O^+)}$$

O hodnotě pH se pak mluví jako o záporném dekadickém logaritmu hydroxoniových iontů. Látky, které vodné roztoky obohacují o ionty $H^+$ označujeme jako kyseliny, látky obohacující roztoky o $OH^-$ jsou zásady. Principem acidobazické titrace je přídavek titračního činidla až do dosažení ekvivalenčního bodu – neutralizace kyseliny či zásady. Polohu ekvivalenčního bodu určujeme za použití **acidobazického indikátoru**. Metyloranž se používá v kyselé oblasti přechodu pH (3,1 - 4,4), fenolftalein v zásadité oblasti přechodu pH (8,3 – 10,0). Indikátoru se aplikuje několik kapek a při změně zabrvení indikuje dosažení ekvimolárního bodu titrace. Spotřeba titračního činidla při takové titraci je pak hodnotou pro výpočet v acidimetrii různého typu.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

# Praktické provedení úlohy

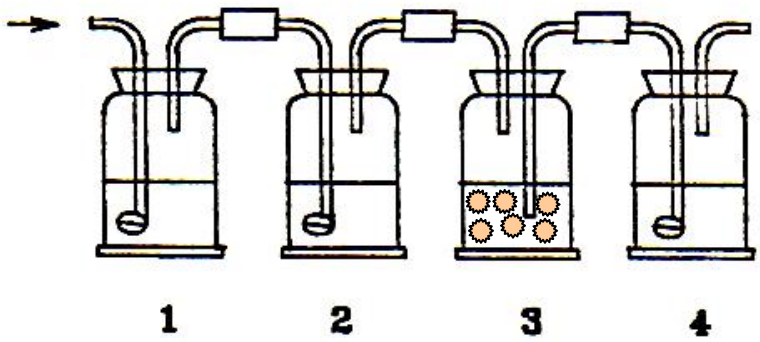
## 1. Experimentální záměr a pokusné varianty

Cílem úlohy je stanovit množství oxidu uličitého uvolněného při dýchání, jímaného do roztoku hydroxidu barnatého, který s ním vytváří nerozpustný uhličitan barnatý. Volný zbytek hydroxidu barnatého stanovíme titrací kyselinou šťavelovou na fenolftalein.

Jako pokusný materiál bude použit zbobtnalý a naklíčený ječmen, včetně klíčních rostlin ječmene s prvním pravým listem kultivovaných ve vodě. Pro inkubaci se navažuje 50 g od vody osušeného materiálu.

## 2. Pracovní postup

1. zapojení sady 4 promývaček se 100 ml roztoků KOH (1. promývačka) a $Ba(OH)_2$ (2. promývačka) a 50 g rostlinného materiálu (3 promývačka) dle schématu na vodní vývěvu a promytí sady vzduchem (zapnutí vodní vývěvy) po dobu 2 minut, upravit proud vzduchu




2. vypnout vodní vývěvu, do promývačky č. 4 dát 100 ml $Ba(OH)_2$
3. zapnout odsávání (vodní vývěvu) na 1 hodinu (rychlost odsávání - cca 2 bublinky za vteřinu, upravit proud vzduchu)
4. po 1-hodinové expozici vypnout opatrně vodní vývěvu, (eventuelně rozpojit promývačky u vodní vývěvy, přepadová nádobka nezobrazená ve schématu)
5. titrovat 10 ml roztoku $Ba(OH)_2$ ze II. a IV. promývačky kyselinou šťavelovou na fenolftalein (2-3 kapky - v zásaditém prostředí červený, v kyselém bezbarvý), zaznamenat spotřebu kyseliny šťavelové (1ml = 1 mg $CO_2$), ekvimolární bod při odbarvení fenolftaleinu, titraci provést opakovaně 3 x
6. stanovit sušinu rostlinného vzorku

(Poznámka: titrace roztoku Ba $(OH)_2$ ze druhé promývačky je jen orientační pro srovnání a eventuální kontrolu výchozího roztoku „barnaté vody“ Ba $(OH)_2$. Tento roztok by měl mít spotřebu větší než výchozí “barnatá voda“.)

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Upozornění pro práci studentů:

! Soustavu promývaček je nezbytné důkladně uzavřít především v místech, kde je zábrus, jinak vzduch neprotéká, týká se to především promývačky s rostlinným materiálem. Rozpojování soustavy promývaček se musí provádět opatrně, jsou spojeny silikonovými hadičkami a ty se obtížně ze skla sundávají (opatrně pracovat, předejít rozbití skla, pořezání aj.). Toto rozpojení soustavy promývaček se provede před vypnutím vodní výměvy pouze vyjímečně.

! Při práci s digitální byretou postupovat dle návodu nebo za účasti učitele.

Nezapomenout na stanovení sušiny.

! Sklo (promývačky i stopky promývaček, kádinky) se důkladně očistí od uhličitanu pomocí slabého roztoku HCl (kyselina chlorovodíková) a opláchne se vodou a destilovanou vodou. Sklo se nechá odkapat na podložce s filtračním papírem dnem vzhůru. HCl se vrací zpět do zásobní lahve, nevylévá se.

## 3. Rovnice acidobazické titrace a výpočet výsledků

Probíhá neutralizační reakce:

$$Ba(OH)_2 + (COOH)_2 \longrightarrow Ba(COO)_2 + 2H_2O$$

Z rovnice je patrné, že 1 ml roztoku kyseliny šťavelové odpovídá 1 ml vyprodukovaného $CO_2$. Rozdíl mezi titrací kontrolního vzorku (zásobní roztok „barnaté vody“) a vzorku z promývačky č. 4 v mililitrech roztoku kyseliny šťavelové odpovídá miligramům $CO_2$ absorbovaném v roztoku. Po přepočtu na celkový objem hydroxidu barnatého v promývačce č. 4 (pozor titruje se 1/10 roztoku z objemu v promývačce) zjistíme množství vydýchaného $CO_2$, to přepočteme na 1 mg sušiny za hodinu expozice.

## Zpracování protokolu

V protokolu budou uvedena vždy 3 opakování spotřeby kyseliny šťavelové při titraci roztoků hydroxidu barnatého z inkubovaného vzorku i výchozí stav, hmotnost sušiny a typ materiálu, včetně výpočtu a správné jednotky. Diskutován bude rozdíl intenzity respirace u tří různých materiálů (zbobtnalý ječmen, klíčící a rostliny s jedním listem). Protokol vypracuje čtveřice studentů.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz