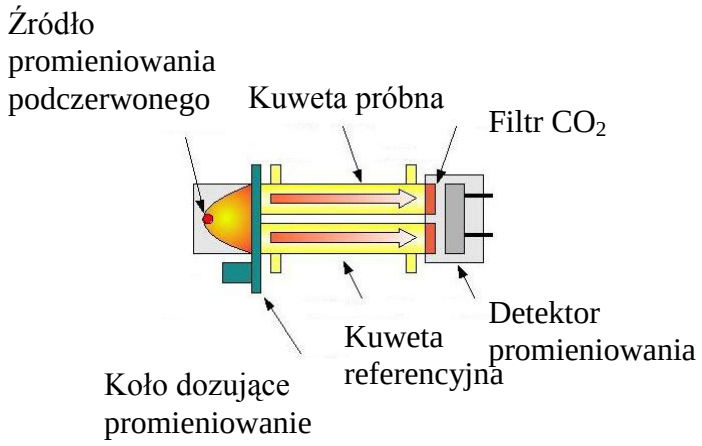
Zasada pomiaru intensywności fotosyntezy netto i oddychania techniką wymiany gazowej, analizatorem gazu w podczerwieni

Pomiar wymiany gazowej do oceny intensywności fotosyntezy stosowany jest przez fizjologów roślin, fizjologów plonowania, ekofizjologów roślin, ogrodników, rolników czy hodowców do badań porównawczych genetycznego potencjału fotosyntetycznego gatunków i odmian oraz do badania wpływu różnych czynników na intensywność procesu fotosyntezy.
Pomiar wymiany gazowej do oceny intensywności fotosyntezy dokonywany jest w dwóch podstawowych systemach:
w systemie zamkniętym (np. stacjonarne analizatory gazu w podczerwieni na salach laboratoryjnych i przenośny analizator gazu w podczerwieni Li 6200) i w
w systemie otwartym (np. przenośny analizator gazu w podczerwieni Li 6400)
Analizator gazu w podczerwieni jest czujnikiem, który rejestruje aktualne stężenie przepływającego przez niego gazu np. CO_2. Pomiar dokonywany jest w oparciu o zdolność gazów o cząsteczkach zbudowanych z 2 pierwiastków (nazywanych też gazami „cieplarnianymi") do pochłaniania radiacji z różnych zakresów promieniowania podczerwonego, zależnych od rodzaju gazu. Akumulacji ciepła przez gaz towarzyszy wzrost jego temperatury.
Prosty schemat typowego analizatora gazu w podczerwieni (IRGA- infrared gas analyzer) przedstawia rysunek 1 (http://www.azosensors.com/Article.aspx?ArticleID=8, zmodyfikowany).



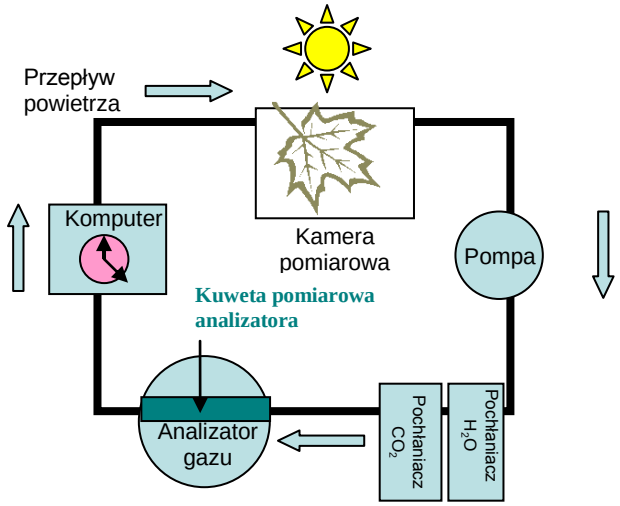
Rys.1 Schemat analizatora gazu w podczerwieni

Promieniowanie podczerwone z odpowiedniej lampy kierowane jest na kuwety w jednakowym natężeniu np. za pomocą luster. Kuweta referencyjna w systemie zamkniętym nie zawiera CO_2 (zawiera N_2) a w otwartym systemie dyferencjalnym przez tę kuwetę przechodzi powietrze atmosferyczne. Stężenie CO_2 w powietrzu atmosferycznym kierowanym do kuwety próbnej jest zmieniane na skutek wymiany gazowej rośliny obecnej w pomiarowym układzie gazowym podłączonym do kuwety próbnej. Na świetle w wyniku fotosyntezy zmniejsza się a w ciemności w wyniku oddychania zwiększa się stężenie CO_2. W efekcie część promieniowania podczerwonego jest absorbowana w kuwecie próbnej, w stopniu zależnym od aktualnego stężenia CO_2. Z tego powodu przez kuwety przechodzi do detektora różna ilość promieniowania, mniejsza przez kuwetę pomiarową. Detektor stanowić może dwu (lub więcej) komorowy pojemnik wypełniony CO_2. Komory detektora przedzielone są membraną stanowiącą ruchomą okładkę kondensatora membranowego. Położenie membrany zależy od tego, ile promieniowania dotarło do komory odbierającej

promieniowanie z kuwety pomiarowej a ile z kuwety referencyjnej i na ile gaz CO_2 w komorach detektora rozszerzył się pod wpływem zaabsorbowanego ciepła. Zmiana odległości membranowej okładki ruchomej od okładki nieruchomej powoduję zmianę pojemności kondensatora. Rolą detektora jest zamiana tej informacji na wskazanie stężenia CO_2 w kuwecie pomiarowej w jednostkach względnych [ppm = μmolCO_2/mol powietrza].

Gazowy układ pomiarowy, podłączony do kuwety pomiarowej, obejmuje zwykle fragment liścia zamknięty szczelnie w **kamerze pomiarowej**. Pomiar nie uszkadza blaszki liściowej i może być wykonany przyżyciowo. W zależności od wielkości i typu kamery pomiarowej możliwy jest pomiar aktywności fotosyntetycznej całego liścia a nawet całej rośliny. Kamera umożliwia dostęp naturalnego lub sztucznego promieniowania PAR do fotosyntetyzujących tkanek. Kamera posiada też wentylator, mieszający znajdujące się w niej powietrze. Przepływ powietrza w układzie pomiarowym, z regulowaną szybkością, jest wymuszany za **pomocą pompy**. Składową układu jest **pochłaniacz pary wodnej** stosowany ze względu na pochłanianie podczerwieni przez ten gaz i wpływ na odczyt detektora. Innym rozwiązaniem może być zastosowanie filtra dla zakresu podczerwieni absorbowanego przez parę wodną lub poprawka pomiaru stężenia CO_2 wyliczana na podstawie wilgotności powietrza, wzrastającej w kamerze na skutek transpiracji. Przy stosowaniu pierwszego rozwiązania technicznego substancje higroskopijne z pochłaniacza muszą być odpowiednio często wymieniane na suche. Potrzebę wymiany sygnalizować może zmiana barwy desykanta pod wpływem wody. Stężenie CO_2 w powietrzu atmosferycznym jest zmienne w szerokich granicach, średnio przyjmuje się 0, 035%v co odpowiada 350ppm lub μmolCO_2/mol powietrza. Układ zaopatrzony być może także w **pochłaniacz CO_2**, wykorzystywany do zerowania aparatu lub do zmniejszenia stężenia CO_2 w układzie przed pomiarem. W czasie pomiaru pochłaniacz ten jest oczywiście odłączony od drogi gazowej. Możliwe jest także zwiększanie stężenia CO_2 w układzie. Źródłem dodatkowego CO_2 bywa często powietrze wydychane przez człowieka do układu przed pomiarem (stężenie CO_2 może w nim osiągnąć 50 tysięcy ppm) . W dużych kamerach pomiarowych CO_2 wyzwalany był w reakcji chemicznej. W nowoczesnych analizatorach gazu w podczerwieni istnieje możliwość podłączenia specjalnych naboi, zawierających stężony CO_2. Na drodze przepływu powietrza w układzie pomiarowym oprócz czujnika stężenia CO_2 montowane być mogą **inne czujniki** np. szybkości przepływu, temperatury powietrza i temperatury liścia, wilgotności powietrza. Wiele aparatów rejestruje także natężenie promieniowania PAR w kamerze pomiarowej i umożliwia jego regulację. Programy komputerowe nowoczesnych analizatorów gazu obliczają dodatkowo takie parametry jak przewodnictwo szparkowe gs [mmol m^{-2} s^{-1}] i jego odwrotność czyli oporność szparkową i międzykomórkowe stężenie CO_2 wewnątrz liścia c_i [ppm]. Znajomość tych parametrów jest przydatna w ocenie ograniczenia asymilacji CO_2 na etapie dyfuzji CO_2 do liścia i jego dostępności wewnątrz liścia w odróżnieniu od ograniczeń wiązania CO_2 na etapie reakcji biochemicznych.

W nowszych typach analizatorów gazu możliwy jest równoczesny pomiar intensywności transpiracji (a nie tylko jej kalkulacja) na podstawie wzrostu wilgotności powietrza w kamerze pomiarowej z transpirującym liściem. Analizatory przenośne znajdują zastosowanie w warunkach laboratoryjnych, ale wykorzystywane są szczególnie w pomiarach terenowych, w warunkach polowych.



Rys. 2 Schemat zamkniętego układu pomiarowego do pomiaru fotosyntezy. Powietrze znajdujące się w układzie krąży podczas pomiaru i przechodzi przez kamerę pomiarową nie kontaktując się z powietrzem atmosferycznym, w związku z czym stężenie CO_2 stale się zmienia.

W przypadku wykonywania pomiaru Fn w **zamkniętym układzie pomiarowym** (rys.2)**,** w którym stężenie CO_2 w powietrzu dochodzącym do kamery pomiarowej zmienia się cały czas, do obliczenia intensywności Fn trzeba znać całkowitą objętość powietrza krążącego w układzie oraz wielkość liścia lub jego fragmentu, zamykanego w kamerze pomiarowej. Razem z odczytami zmniejszającego się stężenia CO_2 z analizatora gazu w podczerwnieni, wykonanymi w znanym odstępie czasu, dane te umożliwiają wyliczenie intensywności Fn wg następującego wzoru:

$$Fn = \frac{(c_p - c_k) \cdot V_N}{P_l \cdot t} \quad [\mu mole\ CO_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}]$$

Gdzie:

c_p – stężenie CO_2 w układzie zamkniętym na początku pomiaru [mol CO_2 · mol^{-1} powietrza w układzie]

c_k – stężenie CO_2 w układzie zamkniętym na końcu pomiaru

V_N –objętość molowa powietrza w układzie [mol], wyliczona na podstawie objętości gazu w układzie i objętości mola gazu doskonałego

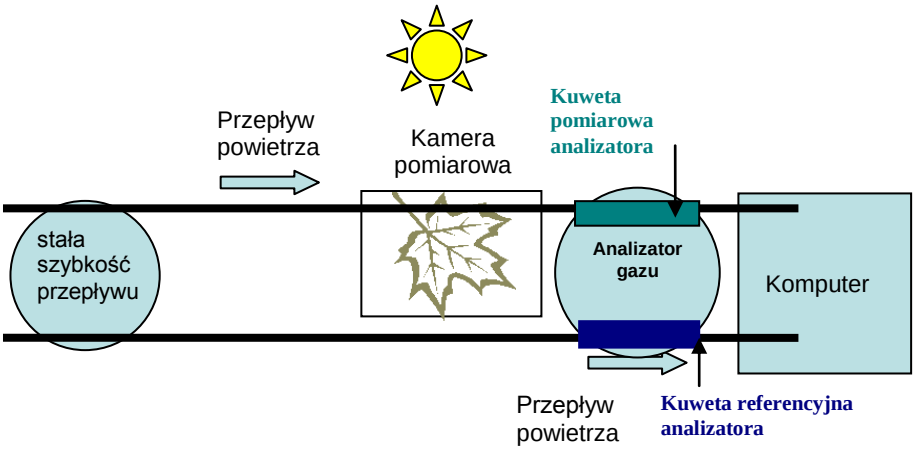
P_l – powierzchnia liścia zamknięta w kamerze pomiarowej [m^2]

t – czas pomiaru zmiany stężenia CO_2 w układzie od c_p do c_k [s]

Dopuszcza się też przeliczanie fotoasymilacji CO_2 na jednostkę świeżej masy liścia.

Wadą pomiaru intensywności fotosyntezy w układzie zamkniętym jest stałe zmniejszanie stężenia CO_2 w powietrzu wchodzącym do kamery z liściem i jego niska wilgotność. Stałe obniżanie stężenia CO_2 w zamkniętym układzie pomiarowym na skutek fotosyntezy może być jednak wykorzystane do badania zależności Fn od stężenia CO_2 i wykreślenia tzw. „**krzywej dwutlenkowej fotosyntezy**".

Pomiaru Fn w **otwartym układzie pomiarowym** (rys. 3), w którym stężenie CO_2 dochodzącego do kamery pomiarowej jest utrzymywane na względnie stałym poziomie, dokonuje się techniką dyferencyją i kompensacyjną. W systemie dyferencyjnym (różnicowym) utrzymywany jest stały przepływ powietrza atmosferycznego kamerę pomiarową i referencyjną analizatora. Skład powietrza atmosferycznego o określonym stężeniu CO_2 i pary H_2O przed wejściem do kamery jest zmieniany po przejściu przez kamerę z fotosyntetyzującą i transpirującą rośliną.



Rys. 3 Schemat otwartego, dyferencyjnego układu pomiarowego do pomiaru fotosyntezy. Powietrze dochodzące do kamery pomiarowej z rośliną pobierane jest z zewnątrz systemu pomiarowego i po przejściu przez kamerę i kuwetę pomiarową analizatora gazu usuwane jest na zewnątrz. Przez kuwetę referencyjną analizatora gazu przechodzi powietrze o atmosferycznym stężeniu CO_2, takie, jakie dochodzi do kamery pomiarowej.

Intensywność fotosyntezy liścia zamkniętego w kamerze pomiarowej w układzie otwartym obliczana jest z różnicy stężenia gazu na wejściu i wyjściu z kamery wg następującego wzoru:

$$Fn = \frac{u_a \cdot c_a - u_w \cdot c_w}{P_l \cdot t} \quad [\mu mole\ CO_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}]$$

Gdzie

c_a- stężenie CO_2 atmosferycznego przed wejściem do kamery [$\mu mol\ CO_2 \cdot mol^{-1}$]

u_a = szybkość przepływu powietrza atmosferycznego przed wejściem do kamery [$mol \cdot s^{-1}$]

c_a- stężenie CO_2 po wyjściu z kamery [µmol $CO_2 \cdot mol^{-1}$]

u_a = szybkość przepływu powietrza po wyjściu z kamery [mol $\cdot s^{-1}$]

pozostałe symbole jak wyżej.

Analogicznie obliczyć można intensywność oddychania komórkowego, uwzględniając odwrotny kierunek zmiany stężenia CO_2 i odniesienie do masy tkanek oddychających.

Zaletą otwartego systemu pomiarowego jest względnie stałe stężenie CO_2 dochodzącego do kamery pomiarowej i możliwość regulacji wilgotności powietrza, co przy utrzymaniu stałego przepływu powietrza przez kuwetę pomiarową i referencyjną analizatora, daje warunki przebiegu fotosyntezy bardziej zbliżone do naturalnych.

Trudność techniczna pomiaru, zarówno w otwartym jak i zamkniętym systemie pomiarowym, wynikająca z bardzo zmiennego **natężenia światła** (zachmurzenie, zacienianie) podczas pomiaru w warunkach polowych, może być rozwiązana przez zastosowanie sztucznego źródła promieniowania PAR, o regulowanym natężeniu. Istotny jest wtedy rodzaj zastosowanego źródła światła, który zapewni odpowiedni do fotosyntezy skład spektralny emisji. Możliwe jest w tym przypadku badanie zależności intensywności Fn do natężenia promieniowania PAR i wykreślenie tzw. „**krzywej świetlnej fotosyntezy**”.

Pomiar **intensywności oddychania metodą fotometryczną**

Oddychanie typu ciemniowego przebiega zarówno na świetle jak i w ciemności. Intensywność tego procesu analizatorem gazu w podczerwieni oznacza się jednak w warunkach ciemności, na podstawie ilości wydzielonego w oddychaniu CO_2. Zasada pomiaru jest identyczna jak w przypadku fotosyntezy z tą różnicą, że stężenie CO_2 w układzie pomiarowym zwiększa się w wyniku oddychania.

W przypadku wykonywania pomiaru oddychania komórkowego R_d w zamkniętym układzie pomiarowym trzeba pamiętać o zaciemnieniu kamery lub użyciu innego typu kamery, o znanej objętości. Miarą ilości oddychających tkanek może być zarówno powierzchnia (liście) lub świeża masa fragmentów rośliny (np. nasiona), umieszczona w kamerze pomiarowej. Wzór do obliczenia intensywności oddychania przyjmuje wtedy postać:

$$R_d = \frac{(c_k - c_p) \cdot V_N}{P_l \text{ lub } m \cdot t} \quad [\mu mole\ CO_2 \cdot kg^{-1} \cdot s^{-1}]$$

Gdzie:

c_p – stężenie CO_2 w układzie zamkniętym na początku pomiaru [mol $CO_2 \cdot mol^{-1}$ powietrza w układzie]

c_k – stężenie CO_2 w układzie zamkniętym na końcu pomiaru

V_N –objętość molowa powietrza w układzie [mol], wyliczona na podstawie objętości gazu w układzie i objętości mola gazu doskonałego

P_l – powierzchnia liścia zamknięta w kamerze pomiarowej [m^2]

t – czas pomiaru zmiany stężenia CO_2 w układzie od c_p do c_k [s]

m - świeża masa umieszczonej w kamerze pomiarowej naważki oddychającego organu [kg]