



The image features three overlapping circles on a dark blue background. Each circle contains a label for an isotope. The top-left circle is labeled $\delta^{13}\text{C}$, the top-right circle is labeled $\delta^{15}\text{N}$, and the bottom-center circle is labeled ^{32}P . The circles overlap in the center, creating a Venn diagram-like structure.

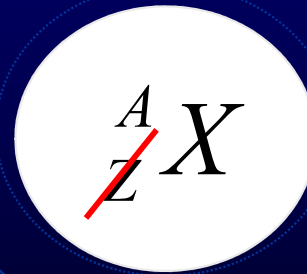
$\delta^{13}\text{C}$

$\delta^{15}\text{N}$

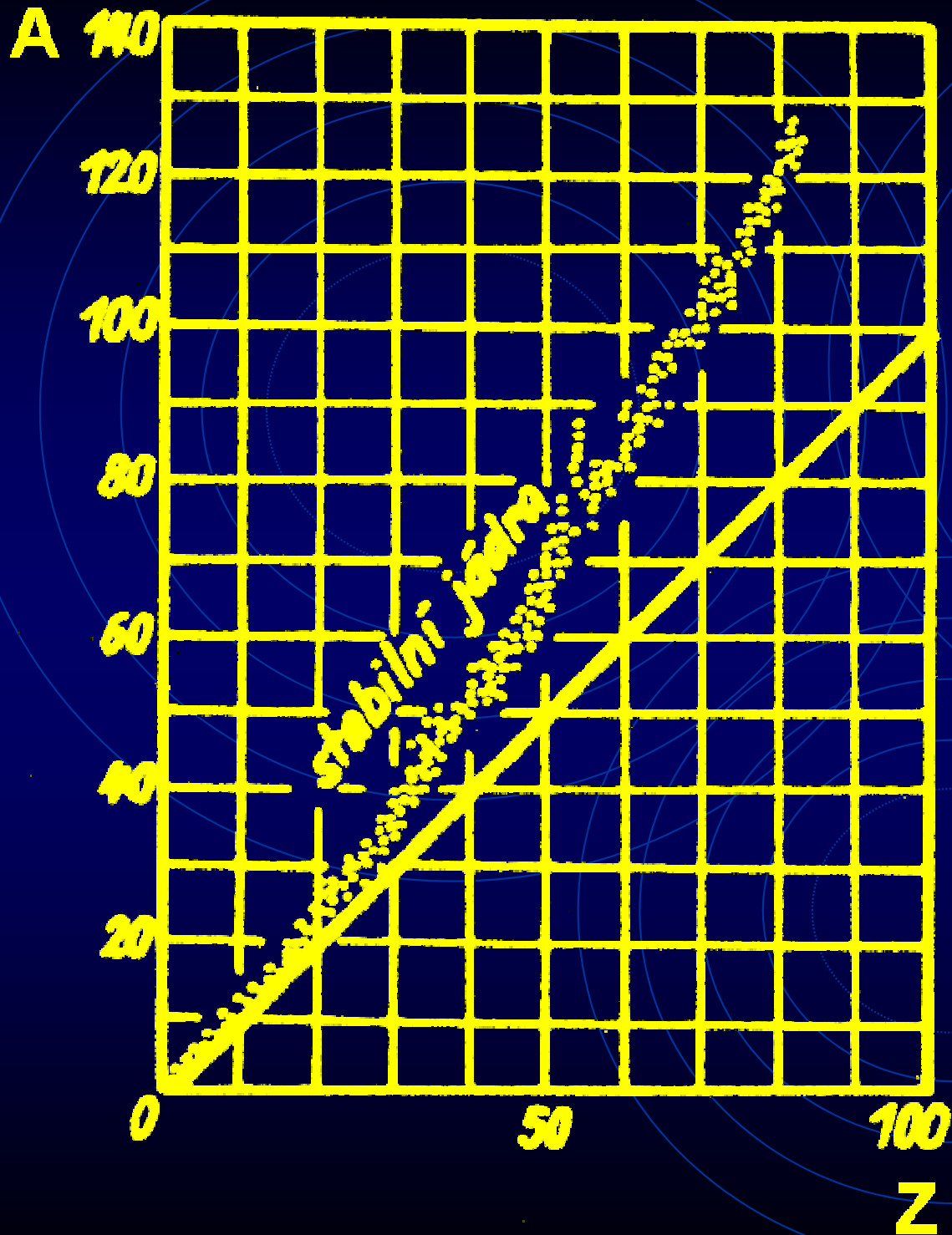
^{32}P

Využití izotopů při studiu symbióz

- všechny prvky se vyskytují ve formě různých izotopů
- stabilní a radioaktivní izotopy
 - Z – počet protonů
 - N – počet neutronů
 - A – počet nukleonů
 - $A = Z + N$



A
 Z X



Oblast stabilních
jader

Z – počet protonů

A – počet nukleonů

Uhlík - carbon (C)

Izotop	Forma	Poločas rozpadu	Přirozený výskyt (%)
^{10}C	radioaktivní	19,3 s	-
^{11}C	radioaktivní	20,3 m	-
^{12}C	stabilní	-	98,89
^{13}C	stabilní	-	1,11
$^{14}\text{C}^*$	radioaktivní (β^-)	5 730 let	10^{-10} ${}^7_7\text{N} + n \rightarrow {}^6_6\text{C} + p$
^{15}C	radioaktivní	2,45 s	-

* radiokarbonová metoda; https://cs.wikipedia.org/wiki/Radiokarbonová_metoda_datování

Vodík - hydrogen (H)

Izotop	Forma	Poločas rozpadu	Přirozený výskyt (%)
^1H	stabilní	-	99,985
^2H	stabilní	-	0,015
^3H	radioaktivní	12,32 roku	-

Kyslík - oxygen (O)

Izotop	Forma	Poločas rozpadu	Přirozený výskyt (%)
^{14}O	radioaktivní	70,6 s	-
^{15}O	radioaktivní	122,2 s	-
^{16}O	stabilní	-	99,759
^{17}O	stabilní	-	0,037
^{18}O	stabilní	-	0,204
^{19}O	stabilní	-	-

Dusík - nitrogen (N)

Izotop	Forma	Poločas rozpadu	Přirozený výskyt (%)
^{12}N	radioaktivní	0,1 s	-
^{13}N	radioaktivní (β^+)	10 min	-
^{14}N	stabilní	-	99,63
^{15}N	stabilní	-	0,37
^{16}N	stabilní	-	-
^{17}N	stabilní	-	-

Fosfor - phosphorus (P)

- 23 izotopů, ^{24}P to ^{46}P (https://en.wikipedia.org/wiki/Isotopes_of_phosphorus)

Izotop	Forma	Poločas rozpadu	Přirozený výskyt (%)
^{31}P	stabilní	-	100
$^{32}\text{P}^*$	radioaktivní (β^-)	14,3 dne	-
$^{33}\text{P}^{**}$	radioaktivní (β^-)	25,3 dne	-

* dceřinný izotop ^{32}S

** dceřinný izotop ^{33}S

Stabilní izotopy – používané termíny a veličiny

- (přirozený) výskyt =
$$\frac{\text{látkové množství studovaného izotopu prvku}}{\text{látkové množství všech izotopů daného prvku}} [\%]$$
- $$R = \frac{\text{výskyt (abundance) těžkého izotopu}}{\text{výskyt (abundance) lehkého izotopu}}$$
- $$R(^{13}\text{CO}_2) = \frac{^{13}\text{CO}_2}{^{12}\text{CO}_2}$$

$$R = (\text{isotopic}) \text{ ratio, izotopový poměr}$$
- mechanismy variability výskytu jednotlivých stabilních izotopů
- standardy pro jednotlivé stabilní izotopy

Mechanismy variability výskytu stabilních izotopů

- **frakcionace** = variabilita ve výskytu stabilních izotopů; jsou výsledkem (malých) rozdílů ve fyzikálních a chemických vlastnostech izotopů daného prvku; čím větší hmotnostní rozdíl mezi izotopy, tím větší rozdíly ve fyz-chem vlastnostech daných izotopů a tím větší frakcionace
 - termodynamické rovnováhy
 - kinetické procesy (asociovány s jednosměrnými procesy – výpar, difúze, disociační reakce...)
 - enzymatické **diskriminace**
- všechny tyto mechanismy vedou k variabilitě výskytu v řádu odchylky o max. jednotky procent z původního množství (!) „těžkého“ izotopu!

Standards pro výskyt stabilních izotopů

- v současnosti jsou akceptovány 4 mezinárodní standardy pro pět základních prvků využívaných v biologickém výzkumu

Primární standard	Izotopový poměr	R ($\times 10^6$) \pm 95% CI
Standard Mean Ocean Water (SMOW)	$^2\text{H}/^1\text{H}$	$155,76 \pm 0,10$
	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	$2\,005,20 \pm 0,43$
	$^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$	373 ± 15
PeeDee belemnite (PDB)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	$11\,237,2 \pm 9,0$
	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	$2\,067,1 \pm 2,1$
	$^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$	379 ± 15
Air	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	$3\,676,5 \pm 8,1$

Standards pro výskyt stabilních izotopů

- 4. primární standard: Canyon Diablo meteorite (CD) – pro síru
- originální SMOW a PDB již vyčerpány
- sekundární standardy:
 - V-SMOW – směs různých vod; IAEA
 - SLAP – standard light Antarctic precipitation – Plateau Station, Antarctica
- hodnoty sekundárních standardů precizně porovnány s hodnotami primárních standardů ($V\text{-SMOW} \sim \text{SMOW}$; $R(D/H)_{\text{SLAP}} = 89,02 \pm 0,05$)
- pro $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ se běžně využívá vzduch

Definice δ (malé delta)

$$\frac{R_{\text{Sample}} - R_{\text{Std}}}{R_{\text{Std}}} = \frac{0,01123 - 0,01124}{0,01124} = -0,00089$$

$$\frac{R_{\text{Sample}} - R_{\text{Std}}}{R_{\text{Std}}} \times 1\,000$$

$$\left(\frac{R_{\text{Sample}}}{R_{\text{Std}}} - 1 \right) \times 1\,000$$

$$\delta [\text{‰}] = \left(\frac{R_{\text{Sample}}}{R_{\text{Std}}} - 1 \right) \times 1\,000 = -0,89$$

$$\delta [‰] = \left(\frac{R_{\text{Sample}}}{R_{\text{Std}}} - 1 \right) \times 1\,000$$

- δ je bezrozměrná veličina
- ‰ indikuje pouze matematickou operaci ($\times 1\,000$)
- vždy nutné specifikovat, s kterým izotopem se pracuje:

$\delta^{13}\text{C}$

$\delta^{15}\text{N}$

$\delta^{17}\text{O}$

$\delta^{18}\text{O}$

$\delta^2\text{H} = \delta\text{D}$

- izotopový podpis (isotopic signature), izotopové složení (isotopic composition)

$$\delta [‰] = \left(\frac{R_{\text{Sample}}}{R_{\text{Std}}} - 1 \right) \times 1000$$

$$\delta > 0$$

$$R_{\text{Sample}} > R_{\text{Std}}$$

tj. výskyt těžšího izotopu je větší ve vzorku oproti standardu,
vzorek je tedy tímto izotopem **obohacen**

$$\delta < 0$$

$$R_{\text{Sample}} < R_{\text{Std}}$$

tj. výskyt těžšího izotopu je větší ve vzorku oproti standardu,
vzorek je tedy tímto izotopem **ochuzen**

standards: $\delta = 0$

$$\delta [‰] = \left(\frac{R_{\text{Sample}}}{R_{\text{Std}}} - 1 \right) \times 1\,000$$

Výhody použití δ

- operací ($\times 1\,000$) se malé rozdíly v izotopových poměrech stávají snáze „vnímatelné“
- technika stanovení izotopových poměrů (IRMS) má mnohem větší přesnost při stanovování relativních rozdílů v izotopových poměrech (vztaženo na standard) než při měření absolutních izotopových poměrů
- při využití mezinárodních standardů jsou výsledky vyjádřené jako δ vzájemně plně srovnatelné

Diskriminace Δ

$$\Delta = \frac{R_{\text{source}}}{R_{\text{product}}} - 1$$

$$\Delta = \frac{\delta_{\text{source}} - \delta_{\text{product}}}{1 + \delta_{\text{product}}}$$

$\Delta > 0 \longrightarrow \delta_{\text{source}} > \delta_{\text{product}}$ produkt je vzhledem k substrátu ochuzen o těžší izotop

$\Delta < 0 \longrightarrow \delta_{\text{source}} < \delta_{\text{product}}$ produkt je vzhledem k substrátu obohacen o těžší izotop

Δ je nezávislé hodnotě δ_{source}

Δ hodnota se mění s teplotou

Technika stanovení izotopových poměrů

CF-GC-IRMS

= Continuous Flow - Gas Chromatography – Isotope Ratio Mass Spectrometer

Zjednodušené schéma:

- izotopy musí být nejprve převedeny do plynné fáze (H_2 , N_2 , CO_2 , CO , O_2 , SO_2 , SF_6)
- plynová chromatografie – He jako nosič
- „mass-spec“ – hmotnostní spektrometr; průchod proudu izotopů (g) elektromagnetickým polem; vychýlení jejich dráhy dle jejich hmotnosti

Příprava vzorků pro mass-spec

C a N v pevných vzorcích (organický materiál, karbonáty)

- oxidace: všechnen C \rightarrow CO₂; všechnen N \rightarrow NO_x
- redukce: CO₂ se neredukuje; NO_x \rightarrow N₂
- vysušení – odstranění veškeré vody
- GC kolona: separace CO₂ a N₂

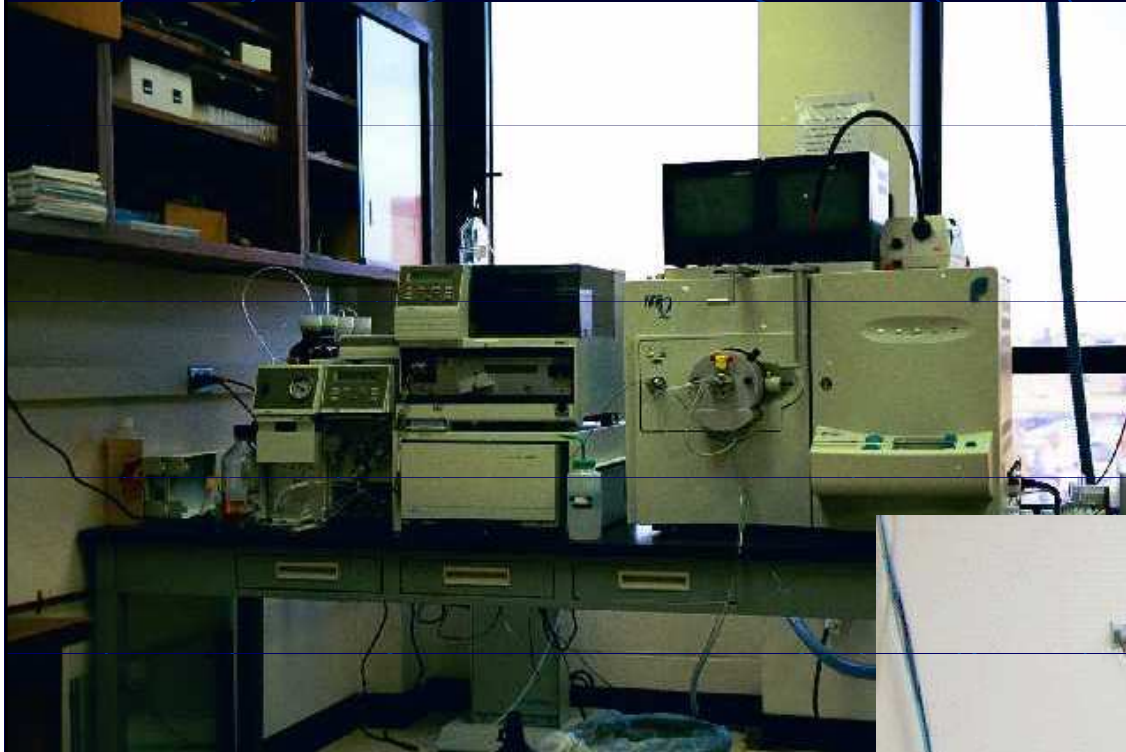
Kyslík ve vodě, organických materiálech nebo karbonátech

- pyrolýza (vysoká t)
- konverze kyslíku na CO
- GC kolona: separace CO od zbytku

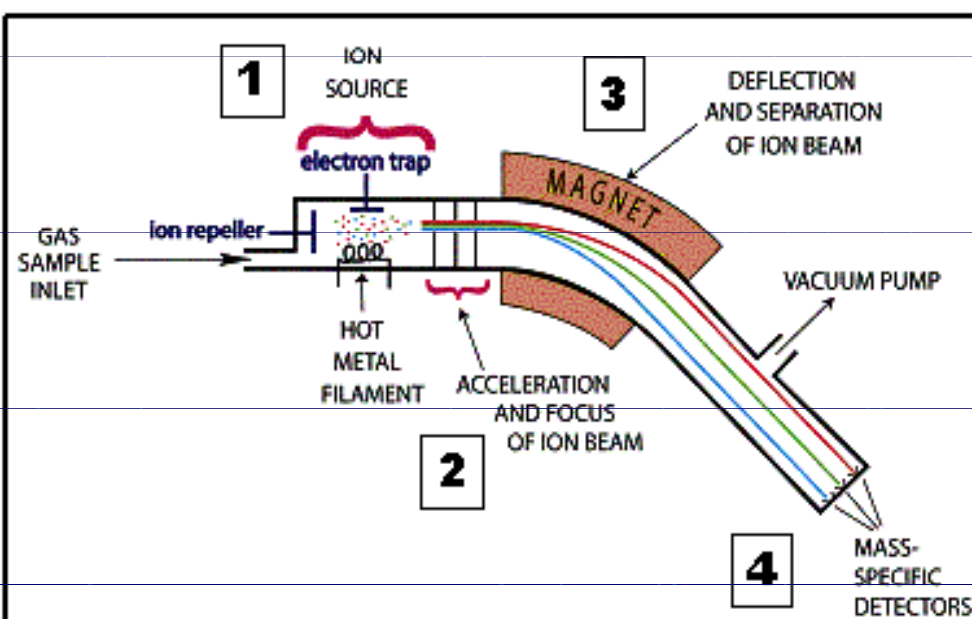
Uhlík a kyslík v CO₂ (např. vzduch)

- GC kolona: separace CO₂ od N₂ a O₂

Mass-spec



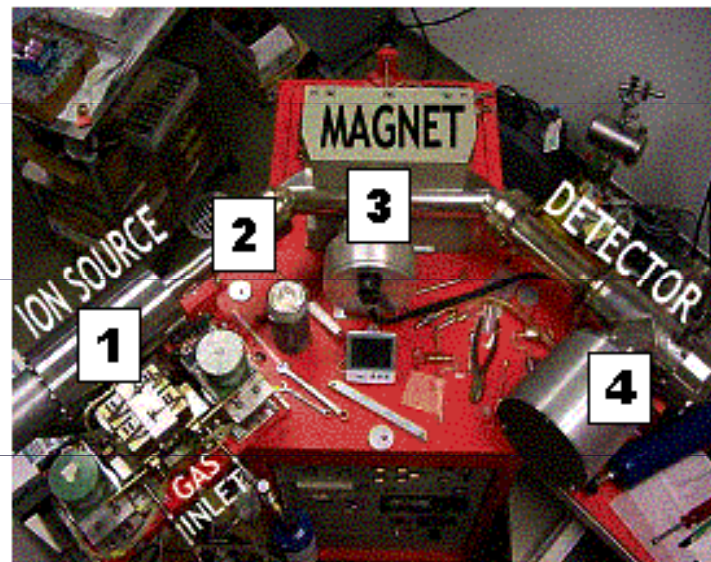
Mass-spec



An isotope ratio mass spectrometer (IRMS) measures the relative abundance of different isotopes in a gas sample. This is accomplished through **four** basic steps (keyed to the diagrams):

1. Conversion of the gas molecules into positively charged particles in the ion source.
2. Focusing and acceleration of these positively charged ions into a high-speed ion beam.
3. Separation of the total ion beam into mass-specific beams within a strong magnetic field.
4. Detection and measurement of the individual mass-specific ion beams (e.g., masses 28 and 29 of N_2 gas: $^{14}N-^{14}N$ and $^{15}N-^{14}N$).

This is all done under high vacuum within metallic framework.



Proč jsou stabilní izotopy tak “trendy“?

- Protože jsou STABILNÍ
 - odpadá radioaktivita
 - nepotřebujete certifikované laboratoře
 - vzorky nepodléhají „zkáze“
- Protože mass-spec je vysoce citlivá metoda
 - N: cca 20 μ g N ~ 0,15 mg sušiny rostlin
 - C: cca 300 μ g C ~ 0,025 mg sušiny rostlin
 - O: cca 0,5 μ l vody
 - C a O v CO₂: 4 nmol CO₂
- Protože ceny analýz jsou dnes již velmi příznivé
 - <http://stableisotopefacility.ucdavis.edu/>



Příčiny variability výskytu stabilních izotopů

Kinetické izotopové efekty

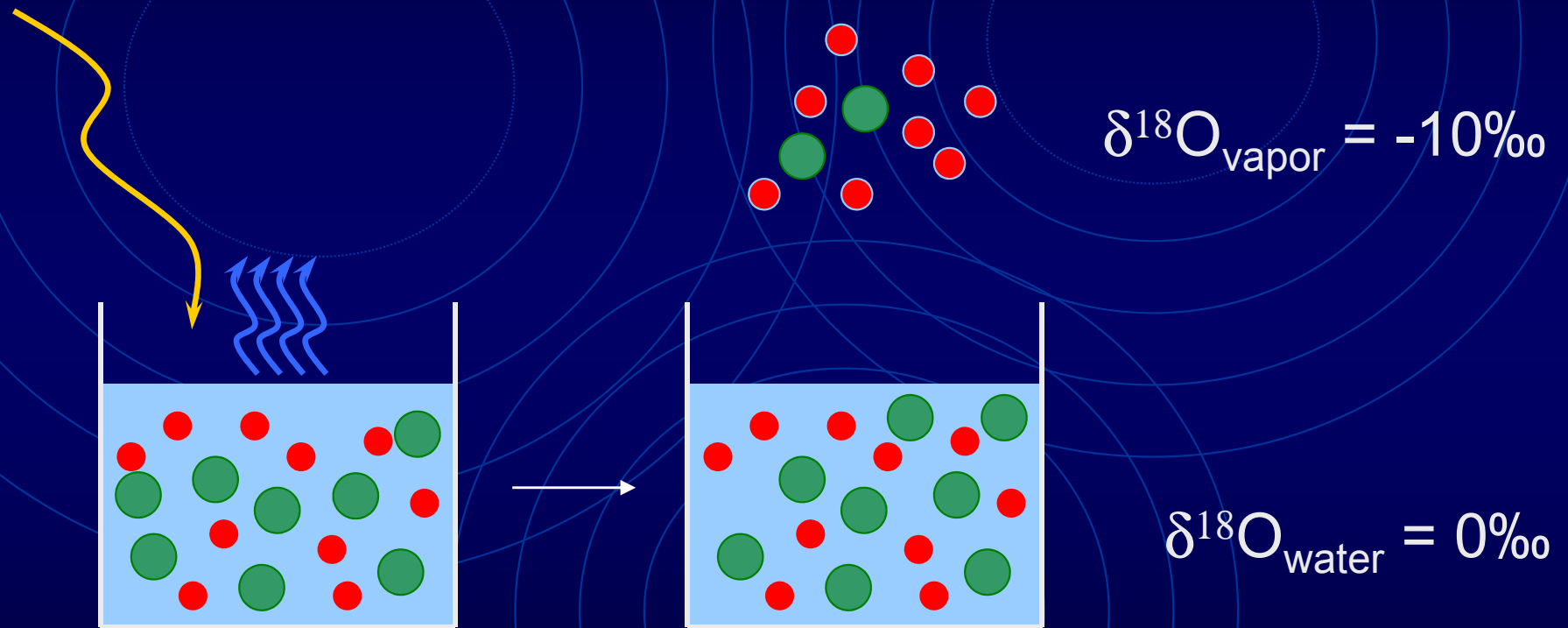
- Uplatňují se u jednosměrných procesů typu:
 - evaporace
 - difuze
 - disociačních reakcí

kdy dochází k bezprostřednímu odčerpávání produktu
(neustavuje se termodynamická rovnováha)

Jsou způsobené různou pohyblivostí různých izotopomerů
(např. $^{12}\text{CO}_2$ vs. $^{13}\text{CO}_2$)

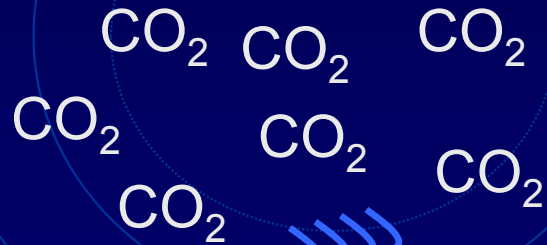
Příčiny variability výskytu stabilních izotopů

Kinetické izotopové efekty



Příčiny variability výskytu stabilních izotopů

Kinetické izotopové efekty

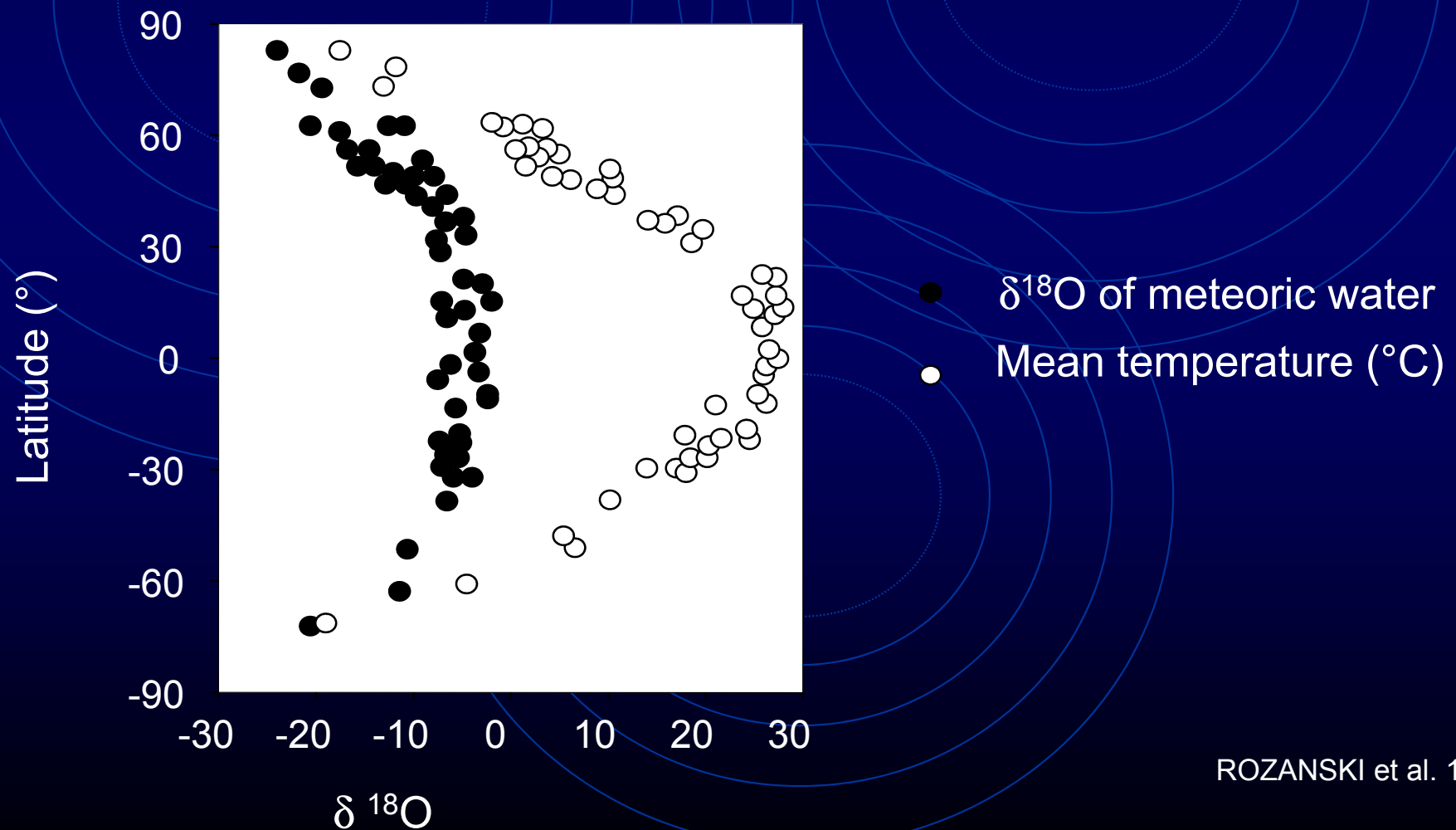


$$\delta^{13}\text{C}_{\text{atmosphere}} = -8\text{‰}$$



$$\delta^{13}\text{C}_{\text{leaf}} = -12.4\text{‰}$$

Latitude effect



Příčiny variability výskytu stabilních izotopů

Rovnovážné izotopové efekty

- Uplatňují se u rovnovážných procesů
- Hmotnost atomu (molekuly) ovlivňuje její termodynamické vlastnosti
- Molekuly obsahující těžké izotopy jsou “stabilnější” než molekuly s lehkými izotopy a mají tedy vyšší abundanci ve “složitějších” sloučeninách



$$\delta^{13}\text{C}(\text{HCO}_3^-) > \delta^{13}\text{C}(\text{CO}_2)$$

^2H

meteoric water



ocean water



sedimentary rock



terrestrial plants



aquatic plants



-300

-200

-100

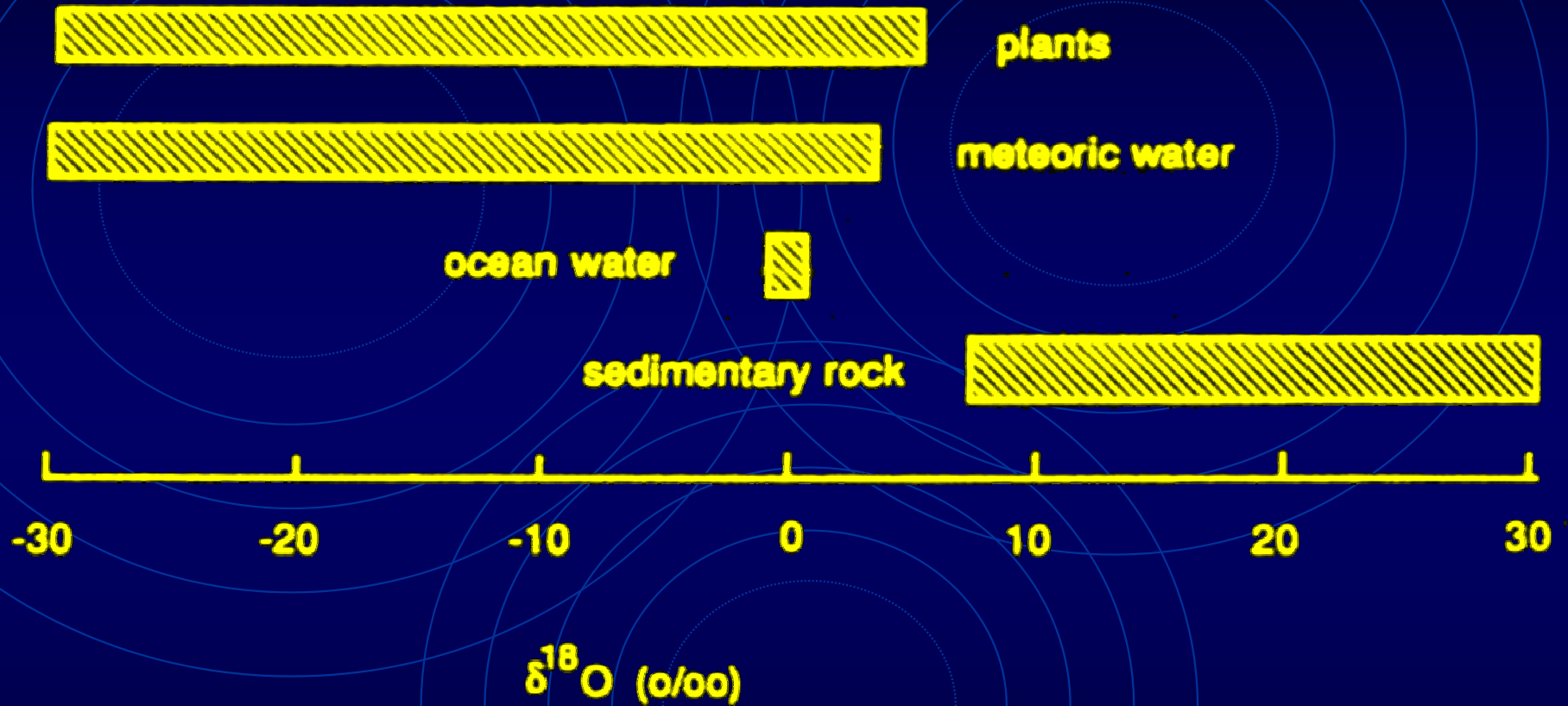
0

100

δD (‰)

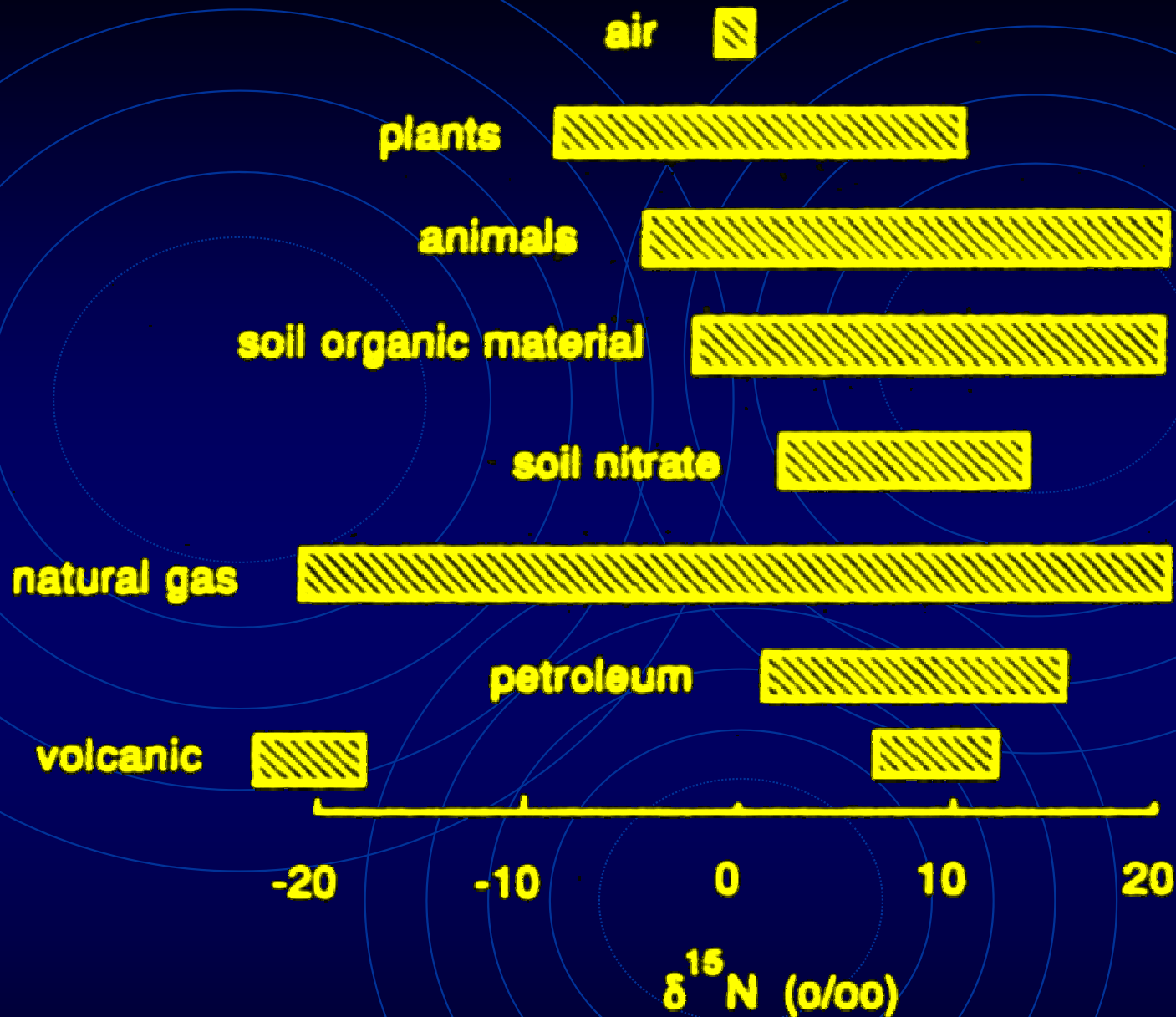
Observed ranges of hydrogen isotope ratios from various substances.

18
O



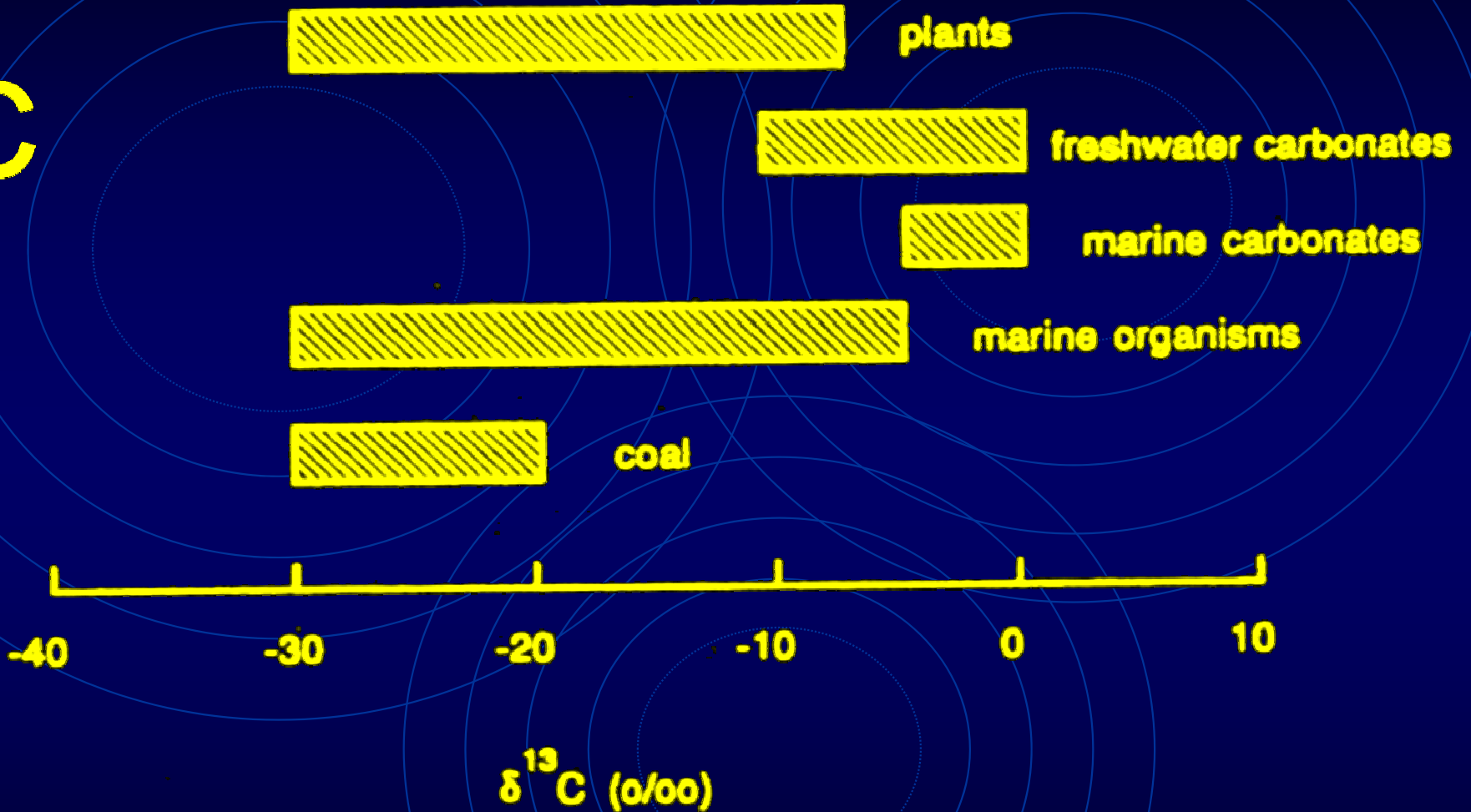
Observed ranges of oxygen isotope ratios from various substances.

¹⁵N

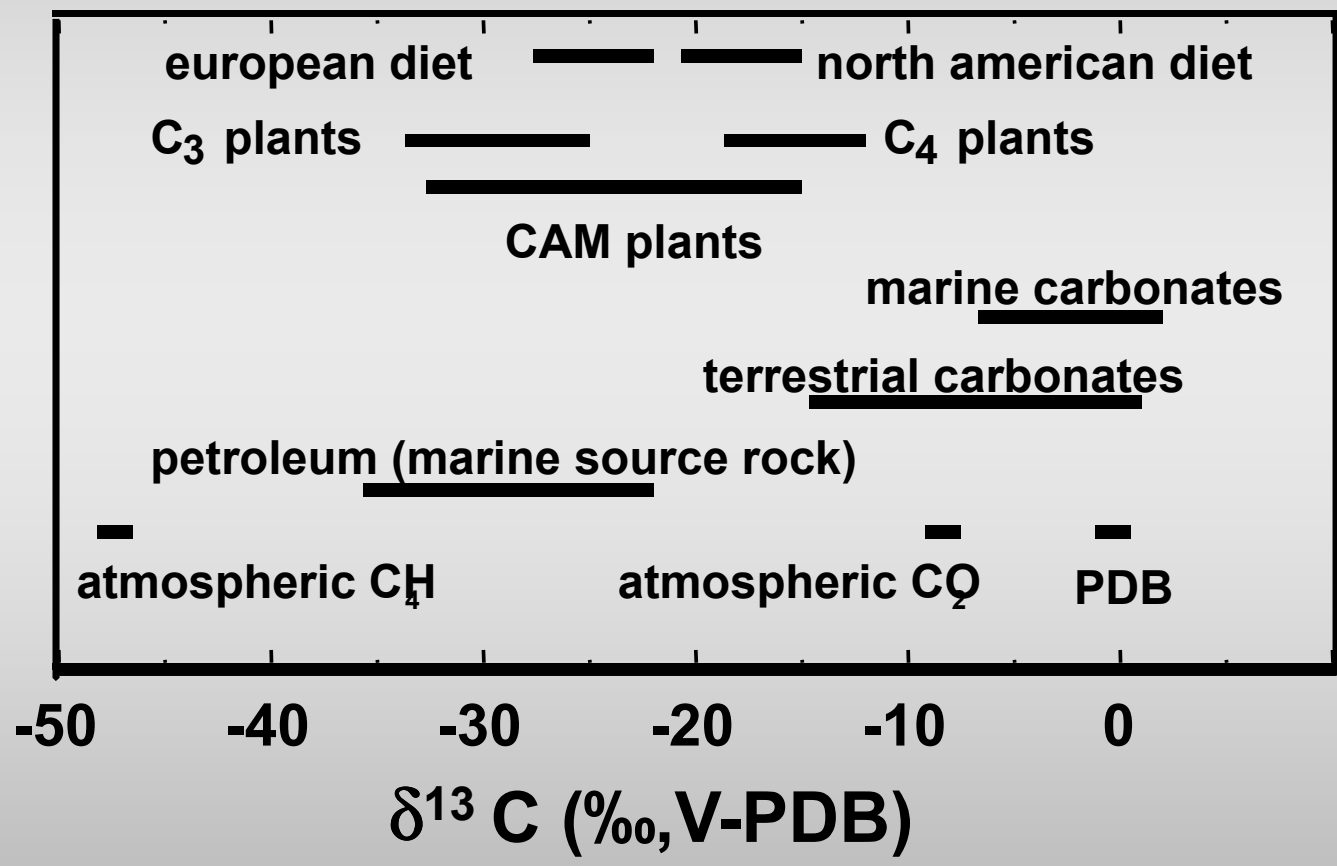


Observed ranges of nitrogen isotope ratios from various substances.

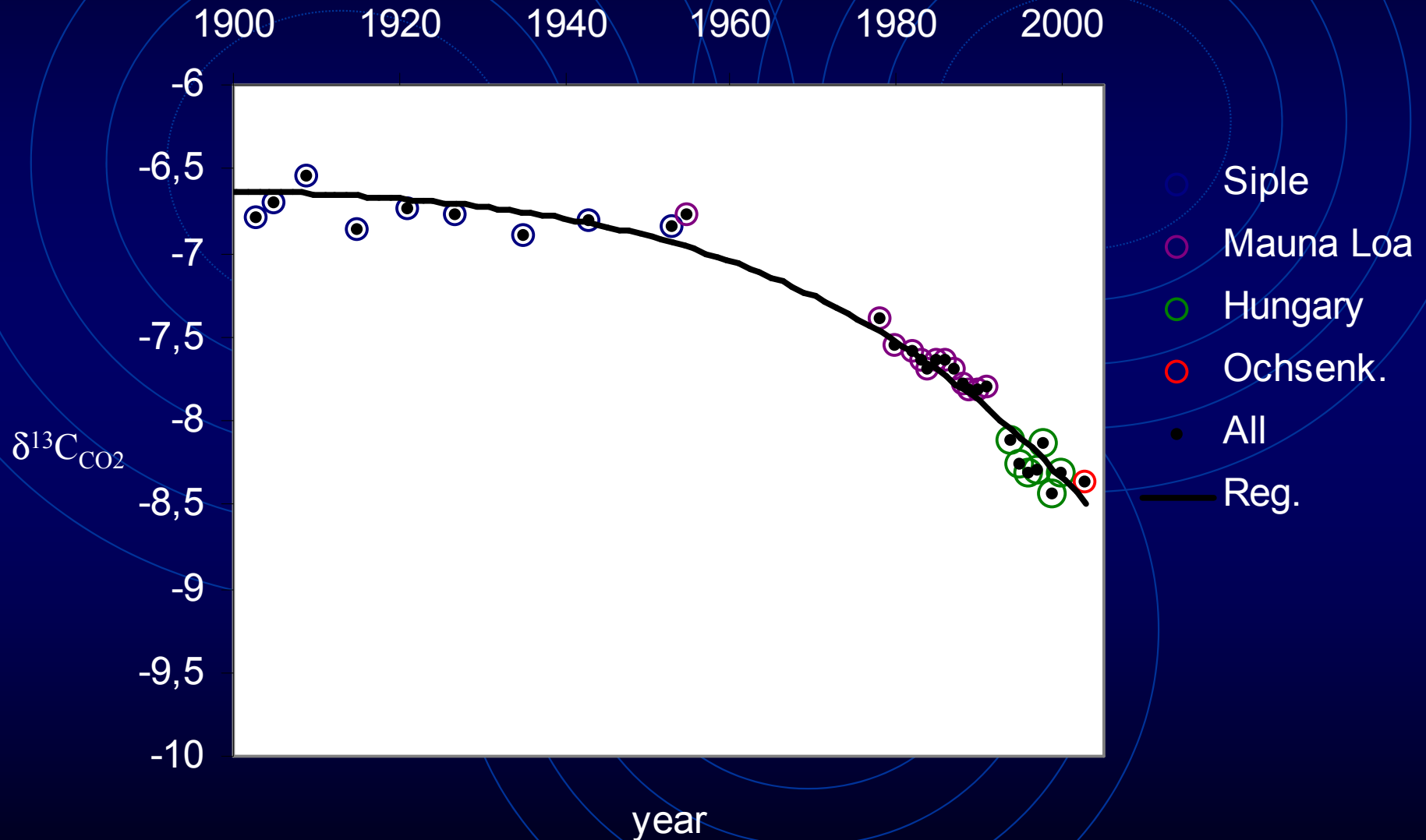
^{13}C

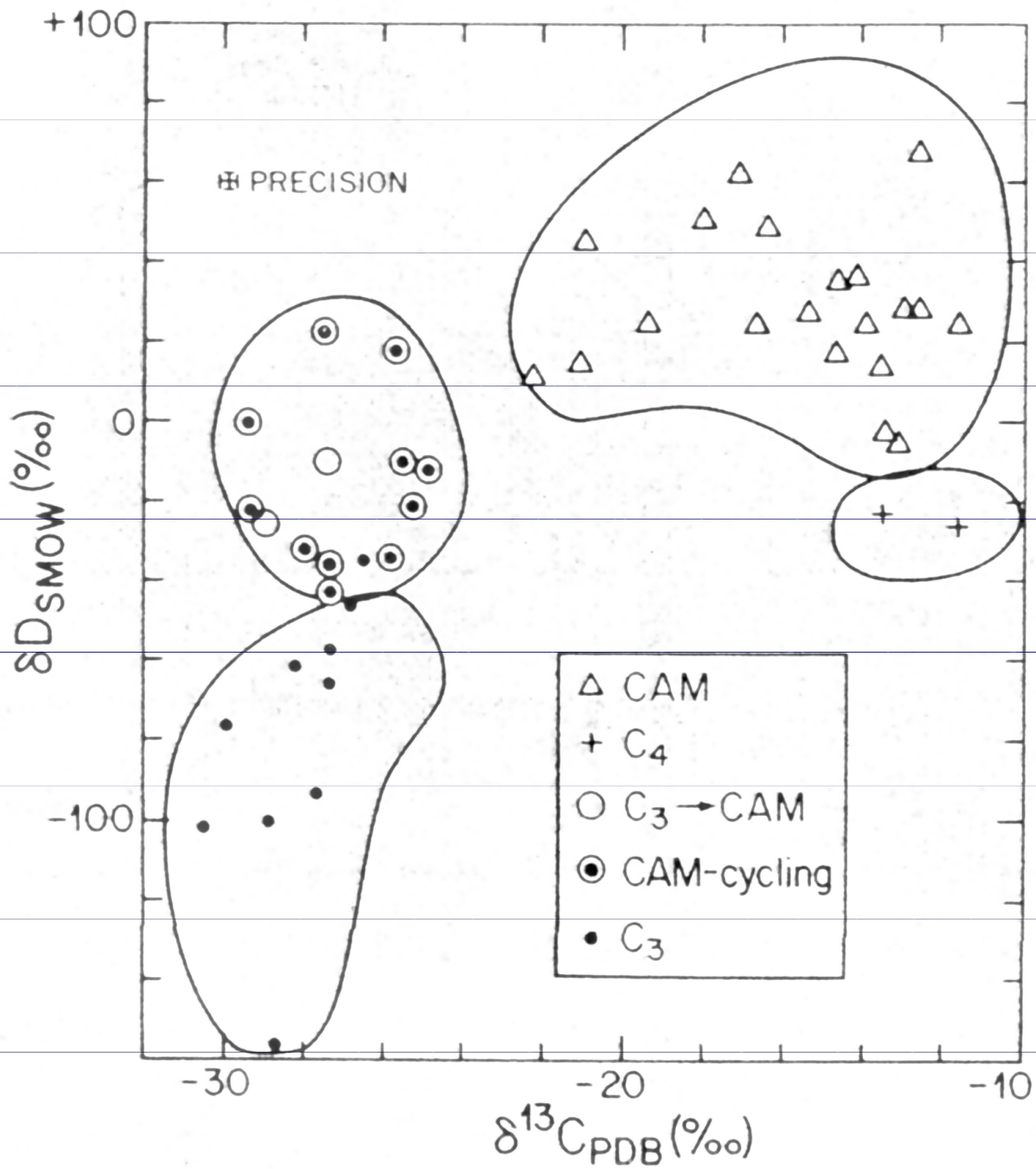


Observed ranges of carbon isotope ratios from various substances.



Global Depletion of $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$





Kinetická frakcionace uhlíku

Occurs when a reaction is sensitive to molecular mass of the substance and, so, the reaction velocity differs for both isotopes; for example carboxylation reactions

C₃ rostliny:



$$\alpha = \frac{R_{\text{CO}_2}}{R_{\text{PGA}}} = \frac{0.01115}{0.01085} = 1.029$$

frakcionační faktor je:

$$\Delta = (\alpha - 1) \cdot 1000 = 29 \text{‰}$$

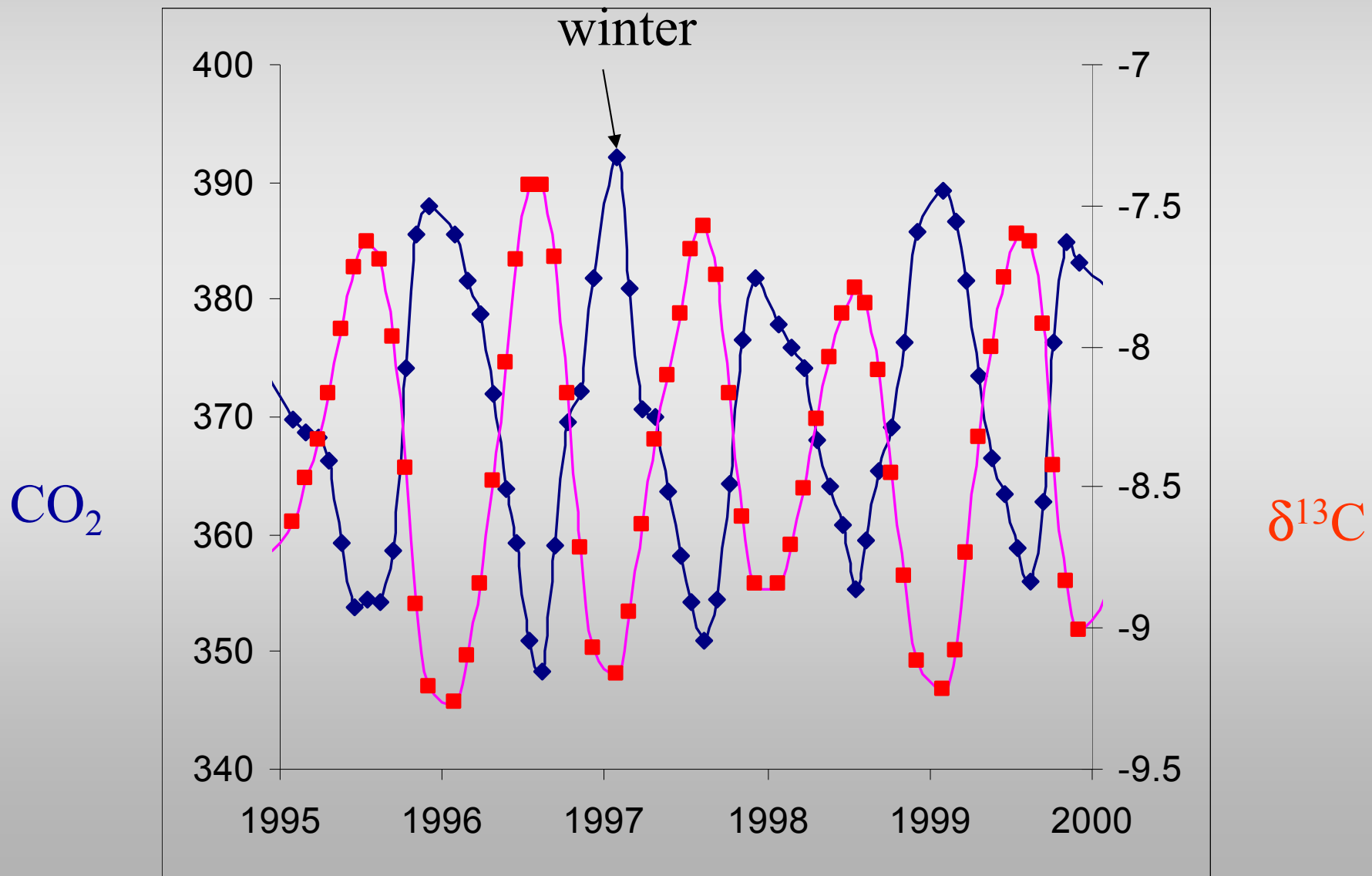
C₄ rostliny:



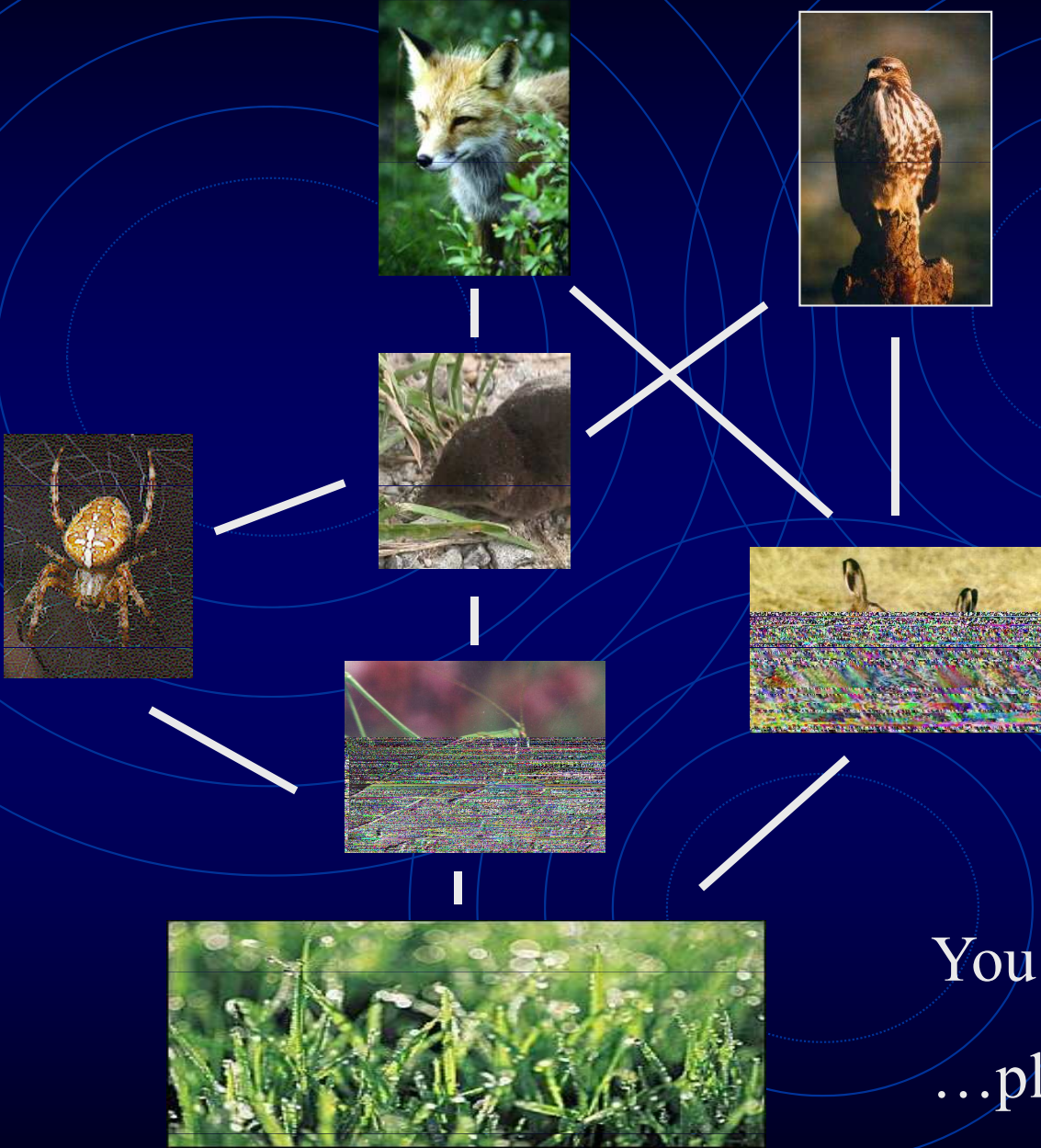
$$\Delta = 2 \text{‰}$$

Schmidt *et al.*
1978

Hungary



Food web



You are what you eat...
...plus a few permille

Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs—a widespread phenomenon[†]

**Franz-W. Badeck^{1*}, Guillaume Tcherkez², Salvador Nogués^{2‡}, Clément Piel³
and Jaleh Ghashghaie²**

¹Potsdam Institute for Climate Impact Research (PIK), P.O. Box 601203, 14412 Potsdam, Germany

²Laboratoire d'Ecophysiologie Végétale, UMR 8079, Bât.362, Université de Paris XI, 91405-Orsay Cedex, France

³Chair of Grassland Science, Technical University of Munich (TUM), Am Hochanger 1, D-85350 Freising-Weißenstephan, Germany

Received 1 November 2004; Revised 6 March 2005; Accepted 6 March 2005

Discrimination against ¹³C during photosynthesis is a well-characterised phenomenon. It leaves behind distinct signatures in organic matter of plants and in the atmosphere. The former is depleted in ¹³C, the latter is enriched during periods of preponderant photosynthetic activity of terrestrial ecosystems. The intra-annual cycle and latitudinal gradient in atmospheric ¹³C resulting from photosynthetic and respiratory activities of terrestrial plants have been exploited for the reconstruction of sources and sinks through deconvolution by inverse modelling. Here, we compile evidence for widespread post-photosynthetic fractionation that further modifies the isotopic signatures of individual plant organs and consequently leads to consistent differences in $\delta^{13}\text{C}$ between plant organs. Leaves were on average 0.96‰ and 1.91‰ more depleted than roots and woody stems, respectively. This phenomenon is relevant if the isotopic signature of CO₂-exchange fluxes at the ecosystem level is used for the reconstruction of individual sources and sinks. It may also modify the parameterisation of inverse modelling approaches if it leads to different isotopic signatures of organic matter with different residence times within the ecosystems and to a respiratory contribution to the average difference between the isotopic composition of plant organic matter and the atmosphere. We discuss the main hypotheses that can explain the observed inter-organ differences in $\delta^{13}\text{C}$. Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.

Rozdíly izotopového složení rostlinných orgánů

Table 1. Differences in ^{13}C -isotopic signature of organic mass or classes of metabolites of different plant organs (p = error level for rejection of null hypothesis of zero difference)

	Belowground— aboveground	Other organs— leaves	Roots— leaves, C_3	Roots— leaves, C_4
Average	1.23	1.26	1.08	0.09
Minimum	-1.4	-2.06	-0.43	-1.8
Maximum	5.64	8.4	3.5	1.5
Standard error of the mean	0.19	0.07	0.09	0.28
p	<0.001	<0.001	<0.001	0.68
n	38	410	78	10
n with diff. < -0.2	1	38	1	2
n with diff. > +0.2	33	333	71	4
n with $-0.2 < \text{diff.} < 0.2$	4	39	6	4

Rozdíly izotopového složení komponent rostlinných orgánů

Table 2. Differences in ^{13}C -isotopic signature for the chemical components cellulose, lipids and lignin as compared with total organic matter

	Cellulose— organic mass	Starch— organic mass	Sugars— organic mass	Lipids— organic mass	Lignin— organic mass
Average	1.29	2.02	1.71	-4.68	-3.17
Minimum	-1.3	0.0	-3.8	-8.8	-6.7
Maximum	4.2	4.1	7.7	-0.6	1.6
Standard error of the mean	0.08	0.21	0.3	0.23	0.30
<i>p</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>n</i>	107	34	46	84	37
<i>n</i> with diff. < -0.2	5	0	6	84	33
<i>n</i> with diff. > +0.2	98	32	36	0	2
<i>n</i> with -0.2 < diff. < 0.2	4	2	4	0	2

http://en.wikipedia.org/wiki/Stable_isotope

