



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

TRANSPORT HUMINOVÝCH LÁTEK SKRZ ROSTLINNOU KUTIKULU

TRANSPORT OF HUMIC SUBSTANCES THROUGH PLANT CUTICLE

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Marcela Smilková

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie Akademický rok: 2020/21

Studentka: **Ing. Marcela Smilková**

Studijní program: Fyzikální chemie

Studijní obor: Fyzikální chemie

Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**

Název dizertační práce:

Transport huminových látek skrz rostlinnou kutikulu

Zadání dizertační práce:

- 1) Rešerše na téma huminové látky a jejich transport skrz rostlinné kutikuly.
- 2) Výběr a charakterizace huminových látek.
- 3) Izolace a charakterizace rostlinných kutikul.
- 4) Charakterizace hydrogelů pro transportní experimenty.
- 5) Studium transportu huminových látek skrz kutikuly.
- 6) Aplikace superabsorbentů s obsahem huminových látek do půdy - návrh experimentů.
- 7) Studium vlivu superabsorbentů na růst rostlin.
- 8) Zpracování výsledků a formulace závěrů práce.

Termín odevzdání dizertační práce: 31.8.2021:

Ing. Marcela Smilková
student(ka)

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.9.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

KLÍČOVÁ SLOVA

foliární hnojení; rostlinné kutikuly; hydrogely, difúze; skleníkové experimenty

KEY WORDS

foliar fertilization; plant cuticles; hydrogels; diffusion; glashouse experiments

MÍSTO ULOŽENÍ

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, Purkyňova
118, 612 00 Brno, Česká republika

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	8
2.1 Metody izolace rostlinných kutikul.....	8
2.2 Studium transportu kapalných látek přes rostlinné kutikuly	10
2.3 Studium vlastností rostlinných kutikul.....	16
3 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	17
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST I	18
4.1 Izolace rostlinných kutikul	18
4.2 Charakterizace rostlinných kutikul.....	19
4.3 Příprava difúzních experimentů	20
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST II	21
5.1 Úvod k experimentální části II	21
5.2 Příprava květináčů a nastavení podmínek experimentů	21
5.3 Stanovování NO₃ –N, NH₄ +–N a Colwell P v půdě.....	22
6 VÝSLEDKY A DISKUZE – EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST I	25
6.1 Charakterizace rostlinných kutikul.....	25
7 ZÁVĚR – EXPERIMENTÁLNÍ A VÝSLEDKOVÉ ČÁSTI I	40
8 VÝSLEDKY A DISKUZE – EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST II	42
8.1 Sklizeň a charakterizace rostlin.....	42
8.2 Analýza půdy po sklizni rostlin.....	44
9 ZÁVĚR – EXPERIMENTÁLNÍ A VÝSLEDKOVÁ ČÁST II	49
10 POUŽITÁ LITERATURA	51
11 ŽIVOTOPIS	56
11.1 PŘEHLED PUBLIKACÍ.....	57
11.2 Publikace v impaktovaných časopisech	57
11.3 Konferenční příspěvek – indexované publikace ve Scopus, Web of Knowledge.....	57
11.4 Konferenční příspěvek – speciální čísla.....	58
11.5 Konferenční příspěvek – abstrakt ve sborníku.....	58

1 ÚVOD

V 50. letech 20. století došlo k výraznému rozvoji nové formy hnojení tzv. foliárního neboli listového hnojení, které efektivně doplňuje do té doby nejpoužívanější typ hnojení vůbec – hnojení pevnými substráty cílenými do půdy. Tato tradiční metoda spočívá v aplikaci pevných granulátů na pole za účelem výživy půdy a kořenového systému rostlin, který vede k celkové výživě plodiny. S rozvojem zemědělství začala být využívána nová metoda ošetření rostlin, a to již výše zmíněné listové hnojení založené na rozprašování kapalných substrátů na listy rostlin. Ty jsou schopné přijímat vláhu, živiny, minerály, ochranné přípravky či stimulanty růstu s mnohem větší intenzitou, než je tomu v případě příjmu látek kořenovým systémem.

Huminové látky se staly využívanými přípravky v oblasti zemědělství, které jsou známé svými blahodárnými účinky na úrodnost, kvalitu půdy a růst rostlin. Jsou to tzv. stimulanty růstu, které se především využívají v první fázi pěstování plodin. V dalších stádiích růstu mají funkci podpůrnou a v kombinacích s dalšími hnojivy a minerály usnadňují transport látek z vnějšího prostředí do vnitřní struktury rostlin. Z těchto důvodů se lignohumát draselný stal předmětem studia předložené práce.

Hlavním cílem disertační práce bylo prozkoumat schopnost těchto látek procházet do struktury listu a ověřit, jakou mírou je lignohumát draselný schopný pronikat skrze rostlinné kutikuly a ovlivňovat tak fyziologii rostlin. Hlavní a zároveň limitující bariérou penetrace látek (pesticidy, herbicidy, insekticidy, stimulanty růstu, živiny, minerály aj.) do listů je tenká vrstva pokrývající povrch celé a každé rostliny tzv. kutikula. Tato přírodní bariéra je tvořena převážně z látek lipofilního charakteru – kutin, kutikulárních vosků a dalších polymerů, proto je často také nazývána jako neživá část rostliny. Tato tenká membrána je zodpovědná za celou řadu důležitých funkcí, tedy nejen regulaci prostupu živin, minerálů a podobných látek, ale také za regulaci vody, transpiraci či ochranu před biotickými a abiotickými vlivy. Právě z těchto důvodů se kutikula stala nejstudovanějším materiálem předložené práce, neboť bez její charakterizace by nebylo možné pochopit podstatu studovaných jevů a principy determinující výživu rostlin či ochrannou funkci kutikuly.

Cílem disertační práce je navrhnout univerzální jednoduchou metodu, která by se dala do budoucna využít v agrochemických podnicích a zemědělských kontrolních ústavech, neboť metodou by bylo možné stanovit využitelné množství (respektive koncentraci) aplikovaného preparátu na rostliny. Rovněž by bylo možné zvolit optimální koncentraci použité látky za určitých povětrnostních podmínek, čímž by nedocházelo ke zbytečnému přehnojování rostlin, které nejsou schopné aplikované množství vstřebat, ba dokonce jim toto nadměrné množství škodí. Z důvodu přebytku hnojení dochází rovněž k odplavování aplikovaných látek do půdy, čímž dochází k jejímu přehnojování a tedy znehodnocování. Jsou-li látky ve vysokých koncentracích může docházet k jejich odplavování k pitným zdrojům vody a jejich kontaminaci, proto je nezbytné se tímto tématem stále zabývat.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Metody izolace rostlinných kutikul

Studium transportu foliárních hnojiv, pesticidů, herbicidů, stimulátorů růstu, minerálů či dalších rostlinných přípravků do struktury listu je podmíněno průchodem přes rostlinnou kutikulu. Tato tenká membrána lipidického charakteru se nachází na povrchu každé rostliny (kořen, stonek, listy). Největší plocha kutikuly se nachází na povrchu listu, odkud jsou adaxiální i abaxiální kutikuly snadno izolovány a následně využívány pro realizaci difúzních experimentů.

Následující kapitoly jsou věnovány literární rešerši, která se zabývá izolačními metodami a obecně procesem získávání kutikul z povrchů listů. Dále byla vypracována rešerše na téma transportu přes rostlinnou kutikulu a simulace foliárního hnojení v laboratorních podmínkách. Tato část disertační práce se rovněž věnuje charakterizacím rostlinných kutikul a studiím jejich fyzikálně-chemických vlastností. V neposlední řadě se věnuje studiu fyzikálních vlastností hydrogelů, které s difúzními experimenty úzce souvisí, neboť hydrogely byly použity jako nosné matrice při realizaci difúzních experimentů.

2.1.1 Enzymatická metoda izolace

Metoda dle W. H. Orgella

Wallace H. Orgell [1] se zabýval jednou z nejšetrnějších metod izolace rostlinných kutikul. S ohledem na použité materiály se tato metoda nazývá jako *enzymatická*, neboť využívá enzymů pektinázy a celulázy, jakožto biologicky aktivních látek umožňujících rozklad mezofylu listu a tím jednoduchou separaci kutikul.

Popsaná metoda je založená na vyseknutí vzorků z čerstvých listů. Takto připravené listy byly zality 0,1 M acetátovým pufrům o pH v rozmezí 3,5 až 4,5. Do tohoto roztoku bylo přidáno 2 až 3 hm. % enzymu pektinázy a na závěr bylo do roztoku přidáno 100 ppm merthiolátu, který zde sloužil jako činidlo zabírající růstu mikroorganismů a vzniku plísní.

Vzhledem k tomu, že listy mají tendenci stoupat k hladině roztoku, musely být zatíženy drátěnou síťkou, aby zůstaly ponořeny na dně nádoby, respektive v roztoku. Pro podpoření vstřebávání enzymů do listu bylo využito přerušovaného vakua a rotační třepačky (100 rpm), která urychlovala rozklad mezofylu. Na základě nabytých zkušeností byla aktivita enzymů podpořena teplotou reakční nádoby na teplotu 35 °C, čímž se enzymy dostaly hlouběji do vnitřní stavby listů, a ne pouze na jejich okraj.

Po uplynutí doby rozkladu mezofylu (v řádech týdnů) byla provedena separace kutikul. Tenké membrány i se sítí byly ponořeny do nádoby s vodou, kde došlo po několika omytí k odplavení odumřelých pletiv a na síti zůstaly pouze čisté rostlinné membrány. Ty byly uschovány v nádobě s vodou obsahující 100 ppm merthiolátu.

Tento postup byl následně optimalizován a do izolačního roztoku byl k enzymu pektinázy přidán i tzv. enzym 19. Kombinace těchto enzymů vedla k rychlejšímu a efektivnějšímu odstranění buněčný zbytků, což je důležité z důvodu opakovatelnosti experimentů.

Orgell [1] provedl izolaci kutikul z listů různých druhů rostlin a zjistil, že u každého druhu rostliny probíhá izolace rostlinné pokožky odlišnou rychlostí. Například rostliny *Convolvulus arvensis* (Svlačec rolní), *Peperomia sp.* (Peprinec), *Philodendron sp.* (Filodendron) nebo *Vinca major* (Brčál větší), jsou schopny průniku enzymů do mezofylu v mnohem kratším čase, přesněji po 3 až 12 hodinách. Naopak v případě typů rostlin *Citrus sp.* (Citrus), *Coprosma sp.* (Korálovka), *Nicotina glauca* (Tabák sivý), *Prunus armeniaca* (Meruňka obecká) a *Persica* (Rdesno) aj. docházelo k rozkladu mezofylu za stejných podmínek od 12 hodin až do 3 dnů.

Veškeré experimenty byly prováděny s mladými, avšak plně vyvinutými listy, které ještě nebyly vystaveny dlouhodobému působení nežádoucích vlivů, jako jsou hmyz, plísně, povětrnostní

podmínky či sluneční záření. Z Orgellova pozorování bylo zjištěno, že starší listy sebou nesou řadu nevýhod, které mohou ovlivňovat izolace a následně výsledky transportních experimentů, například poškození kutikul, špatná funkce některých důležitých buněk, které jsou zodpovědné za transport látek apod. Dále u těchto listů může docházet k nedokonalému odstranění buněčných zbytků z kutikul či dokonce nemusí docházet k izolaci vůbec.

Metoda dle L. Schreibera a J. Schönherra

Enzymatickou metodou izolace rostlinných kutikul se zabývali rovněž vědci *Schreiber a Schönherr* [2], kteří využili Orgellových [1] a svých nových poznatků a vydali rozsáhlou vědeckou publikaci, která se zabývá izolacemi rostlinných kutikul, funkcí listů a kutikul nebo transportními procesy vody a rozpuštěných látek prošlých přes kutikulární membrány [2]. Pro svůj výzkum vycházeli z poznatků *W. H. Orgella* [1], avšak posléze tuto metodu upravili, zjednodušili a popsali další možnosti zefektivnění izolace rostlinných kutikul.

Jejich práce je založena rovněž na vzorcích kruhového tvaru z vyvinutých mladých listů *Ficus carica* (Fíkovník). Dále byl připraven izolační roztok, který se skládal z citrátového 0,1M pufru o pH v rozmezí 3–4, neboť bylo prokázáno, že tato hodnota je optimální pro aktivitu enzymů [2].

K takto připravenému roztoku byl přidán azid sodný a to tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla 0,001 M. Azid sodný byl použit jako „dezinfekční“ činidlo zabraňující růstu mikroorganismů, které by znehodnotily vzorky rostlinných membrán. Do izolačního média byl rovněž přidán enzym pektinázy o koncentraci 1–2 hm. %. Experimentálně bylo zjištěno, že pektináza využívaná ve vinařském průmyslu má stejné izolační vlastnosti jako pektináza houbového původu, a navíc je méně ekonomicky náročná. S množstvím přibývajících experimentů byly zjištěny nové poznatky v oblasti použitých enzymů a jejich schopnosti izolace. Byly vyzkoušeny různé kombinace enzymů, avšak nejvíce se osvědčila kombinace pektinázy a celulózy, protože celulóza je ještě levnější než samotná pektináza, čímž byly ještě více sníženy náklady na experimenty [2].

Častým problémem bývá neschopnost průniku enzymů až ke středu listu, v tomto případě je nutné penetraci podpořit přerušovaným vakuem. V případě, že není vakuum při izolaci využito, dochází k prodloužení izolace až o několik týdnů. Pro zvýšení funkce enzymů a jejich schopnosti procházet do mezofylu listů, může být ovlivněno temperovanou nádobou, ve které jsou listy uloženy. Nejvhodnější je teplota v rozsahu 30–40 °C [2].

Tyto experimenty probíhaly po dobu 20 dní, kdy výsledkem byl tmavě hnědý roztok. Toto zbarvení je způsobeno enzymatickou aktivitou rozkládající mezofyl listu. Odumřelé zbytky rostlinných pletiv byly odstraněny z porézních membrán deionizovanou vodou, výsledkem byly průhledné rostlinné kutikuly.

Orgelovou metodou izolace [1] se rovněž inspiroval *Darlington a Cirulis* [3], kteří se zabývali permeabilitou přes kutikuly izolovaných z listů meruňky (*Prunus armeniaca* L.). Kutikuly získávali pouze ze svrchní strany listů meruňky, průměr vzorku odpovídal 18 mm. Dvacet takovýchto vzorků umístili do nádoby a zalili je roztokem s obsahem 33 ml 0,1M acetátového pufru o pH 4,5, do něhož bylo dáno 0,1 g/l merthiolátu a dále sem byla navážena pektináza tak, aby koncentrace činila 25 g/l. Nádoby poté vložili do inkubátoru při teplotě v rozmezí 30–36 °C na dobu 14 dní. Získané kutikuly byly poté využity pro transportní experimenty (α -chloroacetamidů, valerátu sodného, sacharinu a glukosy).

2.1.2 Chemická metoda izolace

Mnohem drastičtější metodou izolace rostlinných kutikul se zabýval *Edgington* [4], který se zaměřoval na transkutikulární permeabilitu fungicidů. Postup přípravy listů je obdobný jako v případě enzymatické cesty, z listů byly vyraženy vzorky o průměru 13 mm. Experimenty byly prováděny na kakaových listech, kde před samotnou izolací byly listy rozlišeny černou fixou na abaxiální a adaxiální kutikuly. Na základě experimentů bylo zjištěno, že abaxiální kutikula, respektive

kutikula s obsahem stomat je schopna rychlejšího průniku látek než v případě adaxiálních kutikul, tedy kutikul, které stomata neobsahují.

Hlavní rozdíl mezi enzymatickou a chemickou cestou je v izolačním roztoku, který je v tomto případě založen na 60 hm. % roztoku chloridu zinečnatém rozpuštěném v koncentrované kyselině chlorovodíkové. Izolační roztok byl do vzorků listů infiltrován prostřednictvím přerušovaného vakua a izolace probíhala po dobu 2 až 3 dnů. Poté byl vzniklý materiál přenesen do nádoby s vodou, kde došlo k odstranění kutikul za pomoci špachtle, která byla předtím ponořena do roztoku streptomycinu (30 µg/ml), který byl temperován na teplotu 4 °C. Nakonec byly získány průhledné tenké struktury.

Kutikuly byly poté podrobeny mikroskopickému pozorování, aby byl zjištěn jejich stav, neboť i sebemenší poškození má velký vliv na difúzní experimenty. Zároveň kutikuly mohly být rozděleny na adaxiální (horní – bez stomat) a abaxiální (spodní – se stomaty). Přitom veškeré manipulace s tímto tenkým materiálem byly prováděny rychle, protože u nich hrozí dehydratace, která může způsobit jejich nevratné poškození [4].

Obdobného procesu izolace využili *Edgington* a *Solel* v roce 1973 [5], kdy byly připraveny kruhové vzorky listů, které byly ponořeny do roztoku 60 hm. % chloridu zinečnatého v koncentrované kyselině chlorovodíkové o koncentraci 11 M. Připravený roztok byl do listů infiltrován pomocí vakua po dobu 2–3 dnů a po uplynutí této doby byly kutikuly ponořeny do čisté vody, z níž byly získány čisté kutikuly [5].

2.2 Studium transportu kapalných látek přes rostlinné kutikuly

Podrobné review o foliárním příjmu rostlin vypracovali *Wang* s *Liuem* [6]. Tato práce sumarizuje hlavní poznatky o foliárním hnojení, příjmu pesticidů a chemikálií v závislosti od typu rostlinného listu, od působení jiných pomocných látek či od změny přírodních podmínek. Review sepsali na základě poznatků získaných za posledních 15 let. Ve své práci upozorňují na důležitost fyzikálně chemických vlastností látek aplikovaných na rostliny a jejich vliv na transport, respektive vliv působení aktivních látek na rostlinu. Jejich oblast zájmu se soustředila na molekulární hmotnosti či lipofilní povahu aktivních látek, v neposlední řadě taktéž na koncentraci a působení pH.

Značná část této práce je věnovaná vnitřní stavbě listu (epikutikulárnímu vosku, kutikule, stomatům aj.). Dále vlivu kutikul na sorpci a penetraci aplikovaných látek a v neposlední řadě vlivu povrchově aktivních látek přidávaných do rostlinných přípravků. Obvyklá koncentrace povrchově aktivních látek používaných v pesticidech se pohybuje okolo 0,1 až 0,5 hm. %.

Dle zjištěných poznatků *Yu* a jeho kolegů [7] rostlinné kutikuly nejsou schopny propouštět látky větší než 1 kDa, proto jsou zpravidla připravovány herbicidní přípravky s aktivními složkami o relativní molekulové hmotnosti 100–500 [8]. Významným postřehem v této oblasti foliárního příjmu byl taktéž fakt vlivu pH na aplikované aktivní médium s obsahem slabých kyselin. Bylo prokázáno, že rostlinný příjem se zvyšuje se snižující se hodnotou pH přípravku. Experimenty byly měřeny za pomoci HPLC metody. Výsledkem naměřených hodnot bylo stanovení množství prošlého barviva Congo Red 420 rostlinnou kutikulou simulující foliární příjem rostlin. Jejich experimenty byly založeny na skleněných deskách, na které byly položeny listy studovaných rostlin a na tyto listy byla injekční stříkačkou nanášena směs s obsahem barviva.

Velmi významnou publikací zabývající se mobilitou pesticidů a stanovováním rychlosti penetrace látek pro foliární příjem popisují *Bauer* a *Schönherr* [9], [10]. V těchto publikacích se zabývají vlivem molekulové hmotnosti, respektive velikosti molekul hydrofilních a lipofilních látek a jejich schopnosti transportu přes izolovanou rostlinou kutikulu. V práci stanovovali rychlostní konstanty a difúzní koeficienty penetrovaných látek. Nižší hodnotu rychlostní konstanty stanovili pro rostlinné kutikuly z hořkého pomeranče (*Citrus aurantium* L.). Vyšších hodnot rychlostní konstanty bylo docíleno pro kutikuly zeleného pepře (*Capsium annuum* L.). Z provedených experimentů bylo zjištěno, že rychlostní konstanta desorpce odpovídá parametrům mobility pesticidů, přičemž je

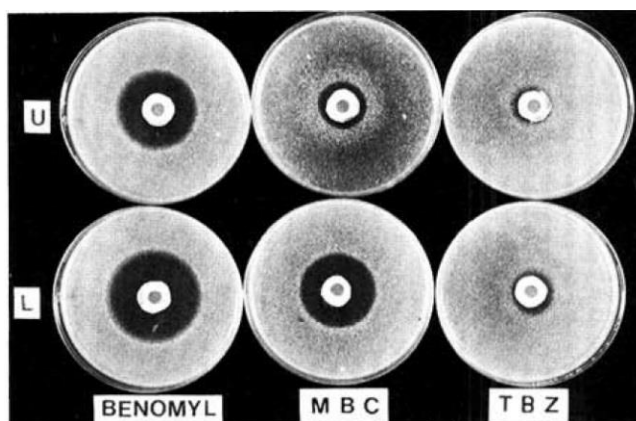
nezávislá od lipofilní povahy roztoku. Podobných výsledků bylo docíleno rovněž v práci *Bakera* a jeho kolegů [11], kteří se zabývali transportem látek do vnitřní struktury listů rostlin.

Studiem transportu a charakteru voskových kutikul se zabýval *Santier* et al. [12]. V jeho publikaci byla penetrace hydrofilních a hydrofobních sloučenin skrz izolované rostlinné kutikuly zkoumána v uzavřeném difúzním systému (kutikula/agar). Kutikuly, které byly pro tyto experimenty vybrány, reprezentovaly dva typy mikrostruktur, které byly charakterizovány lamelární či retikulární zónou. Transport látek byl studován pro glyfosfáty a isoproturony. Penetrace glyfosfátu byly velmi nízké, naopak transport isoproturonu byl mnohem vyšší, a to zejména u druhů rostlin pepře a rajčat. Pro statistické vyhodnocení byla využita analýza rozptylu a Newman-Kesuls test, založený na STAT-ITCF programu.

Penetracemi aktivních látek do listů se rovněž zabývali *Zelená* a *Veverka* [13]. Tato schopnost příjmu nutričních látek hraje velmi důležitou roli v systémových aktivitách rostlin, dokonce umožňuje urychlení procesu léčení rostliny v případě nějakého poškození. Vliv povrchových a kapalných hnojiv na transport fungicidů byl studován difúzními experimenty založenými na kutikulách izolovaných z listů rostliny *Bryophyllum calycinum*. Roztoky fungicidů byly poté rovnou pipetovány na vzorek kutikuly, která byla položena na agarózový hydrogel, který obsahoval výtrusy typu *Cladosporium cladosporioides*. Po době penetrace bylo provedeno měření průměrů inhibičních zón. Velikost těchto zón studovaného fungicidu. Stejným způsobem byly provedeny experimenty, u nichž byl fungicid pipetován přímo na vzorek kutikuly a na vzorek agarózového gelu. Na základě tohoto zkoumání bylo zjištěno, že kutikulární efekt penetrace aktivních látek má minoritní podíl, ve srovnání s penetrací přímo na gel. Dále bylo prokázáno, že prostupnost látek skrz kutikuly vede ke snížení průměrů inhibičních zón fungicidů aplikovaných na rostlinnou kutikulu (Obr. 1).

Metoda transportu spočívala v přípravě agarózového gelu o pH 6,5, který byl nalit do čisté Petriho misky, kde byl ponechán ke zchladnutí. Na připravený hydrogel byla položena kutikula, na niž byl aplikován fungicidní přípravek. Petriho miska byla uzavřena víkem a celý systém byl ponechán v klidu, aby mohla být sledována penetrace aplikované látky. Takto připravený difúzní experiment byl průběžně měřen po dobu 3 dnů, kdy byly zaznamenávány inhibiční zóny vzniklé při průniku. Naměřená data byla statisticky vyhodnocena a z výsledků měření bylo možné posoudit, jak vhodně kombinovat fungicidy s povrchově aktivními látkami a hnojivy tak, aby přípravky dosahovaly nejlepšího efektu.

Transkutikulárním pohybem fungicidů přes rostlinné kutikuly se také zabývali v roce 1972 *Solel* a *Edgington* [14]. Tyto experimenty zaměřené na transport látek přes vnější stranu rostlinných kutikul byly provedeny na základě izolovaných rostlinných kutikul z listů *Malus sylvestris* (Jabloň lesní), které byly položeny na gel připravený z bramborové dextrózy. Transport látek probíhal po dobu 24 hodin, poté bylo zjištěno, že efektivnějšího prostupu látek jsou schopny abaxiální (spodní) kutikuly než kutikuly adaxiální (svrchní). Dále bylo porovnáno několik typů fungicidních látek, čímž byla prozkoumána jejich schopnost průniku. Systém pro studium těchto experimentů je uveden na obrázku (Obr. 1).



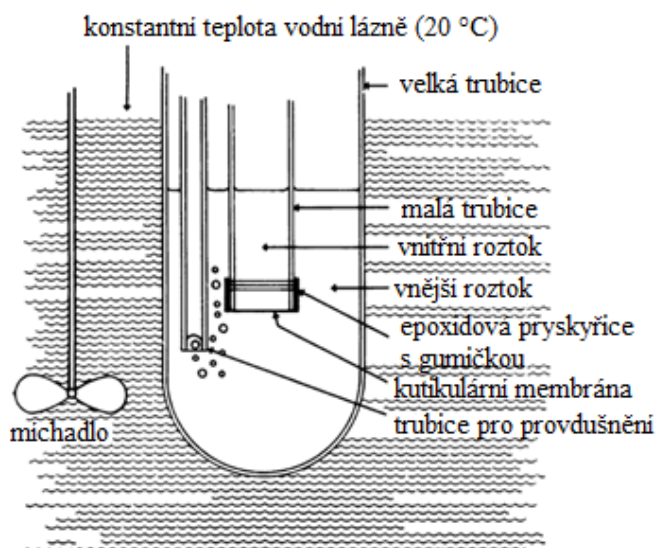
Obr. 1 Inhibiční zóny po 24 hodinách penetrace fungicidů adaxiální (U) a abaxiální (L) kutikulou [14].

Na základě experimentů bylo provedeno stanovení rychlosti transkutikulárního pohybu fungicidů aplikovaných na kutikuly izolované ze svrchní a spodní strany listu. Dle dosažených hodnot bylo zjištěno, že adaxiální kutikuly mají odlišné schopnosti penetrace než abaxiální kutikuly. Ze získaných dat byl stanoven transkutikulární pohyb látek v procentech, kdy jako nejrychleji penetrovatelným fungicidem přes adaxiální kutikulu se stal thiofanát-methyl, dále thiofanát, benomyl a methyl 2-benzimidazolkarbamát. V případě abaxiální kutikuly byl nejrychlejší opět thiofanát-methyl, benomyl, thiofanát a na posledním místě methyl 2-benzimidazolkarbamát.

Foliárním příjmem živin se zabývali také *Okuda* s kolegy [15]. Ve své práci hodnotili vliv aplikovaných fosforečnanových sloučenin na listy a vliv pH na foliární příjem za využití metody radioaktivního značení. *Okuda* popisuje pět druhů metod příjmu živin rostlinou, jednou z nich je metoda máčení, kartáčování, sprejování, kapkování a v poslední řadě tzv. lepicí metoda. Tato technika využívala filtračního papíru nebo gázy, na něž byly aplikovány fosforečnanové nebo fosforečnan-močovinné sloučeniny, které byly k povrchu listu fazole připevněny lepicí páskou.

Z naměřených dat foliární absorpce zjistili, že příjem fosforečnanových sloučenin je výrazně ovlivněn přidavkem močoviny do připravených směsí. Značný vliv na transport látek přes izolované rostlinné kutikuly z listů fazole měla rovněž různá hodnota pH. Transkutikulární transport byl nejefektivnější u vzorků kyseliny fosforečné s přidavkem močoviny. Dále bylo zjištěno, že nejlepších výsledků transportu bylo dosaženo při pH o hodnotách 2,6 a 5,5–6,2, naopak nejméně vhodné bylo pH 4,5.

Penetrace iontů přes izolované rostlinné kutikuly studovali *Yamada* s kolegy [16]. V této práci vytvořili transportní aparaturu složenou z izolované rostlinné kutikuly, která sloužila jako přepážka rozdělující vnitřní a vnější komory difúzní aparatury (Obr. 2). Celý experiment spočíval v izolaci rostlinných kutikul, které získávali za využití Orgelovy izolační metody [1], která je založena na působení enzymů. Navíc, tuto metodu izolace modifikovali o další druh enzymů, kromě pektinázy využili rovněž enzymů celulózy a hemicelulózy, kde se inspirovali *Hinsvarkem* [17].



Obr. 2 Aparatura pro měření permeability iontů přes kutikulární membrány [16].

Yamada s kolegy [16] izoloval kutikuly z plodů rajčat a listů zeleného česneku. Následně byly připraveny roztoky, které obsahovaly radioaktivně značené prvky Ca^{2+} , Rb^+ , SO_4^{2-} a Cl^- , u nichž byl pozorován průchod přes rostlinné kutikuly. Transkutikulární pohyb radioaktivně značených prvků byl studován při přechodu z vnitřního do vnějšího roztoku, respektive naopak. Tímto způsobem byla studována rychlost prostupu prvků a schopnost kutikul penetrovat v jednom či druhém směru. V práci také zohledňují přítomnost stomat.

Penetrace radioaktivních kationtů Ca^{45} a Rb^{86} a aniontů S^{35}O_4 a Cl^{36} probíhala přes enzymaticky izolované kutikuly plodů rajčat, které neobsahovaly stomata, a pře listy česneku, které stomata obsahovaly. Pohyb penetrace iontů byl sledován z vnějšího do vnitřního roztoku a naopak. Na základě tohoto experimentu bylo možné stanovit schopnost průchodu iontů od nejlépe po nejhůře penetrovatelné, a to v následujícím pořadí Ca^{2+} , Rb^+ , SO_4^{2-} a Cl^- . Efektivnější transport iontů probíhal u kutikul izolovaných z rajčat, které neobsahovaly stomata než u kutikul z listů česneku, které stomata obsahovaly.

O rok později stejný autor vydal článek [18] zabývající se penetrací organických sloučenin přes rostlinné kutikulární membrány. Tato práce se nejen zabývá rychlostí penetrace organických sloučenin, ale také vazností sloučenin na povrch kutikul. Jako studované látky byly použity močovina, hydrazin kyseliny maleinové, *N,N*-dimethylaminosukcinová kyselina. Pro studium penetrace byla využita aparatura z předcházející práce [16], která je uvedena na obrázku (Obr. 2). Rychlost penetrace přes membránu byla měřena v závislosti na čase a stanovení transportu prošlé látky. Detekce probíhala za pomoci radioaktivního značení prvků, kdy byl pozorován přírůstek těchto prvků v přijímací trubici, odkud byl vzorek odebírán.

Na základě uvedených experimentů a provedených srovnání bylo zjištěno, že nejrychleji penetrovanou látkou přes kutikuly rajčete byla močovina, která dosahovala dvakrát vyšších výsledků než *N,N*-dimethylaminosukcinová kyselina a šestkrát vyšších výsledků než hydrazin kyseliny maleinové.

Permeabilitou skrze kutikuly izolované z listů meruněk se zabýval *Darlington* a *Cirulis* [3]. Pro studium penetrace se inspirovali Orgelovými metodami [1], tedy izolace kutikul a sestavení transportní techniky bylo velmi podobné. Jako transportní sondu využili fluorescein disodný, který byl použit do studovaných roztoků α -chloracetamidu, glukózy, fruktózy, valerátu sodného a sacharinu. Toto fluorescenční barvivo bylo využito z důvodu rychlé a snadné detekce, neboť látku je možné rozpoznat již při velmi nízkých koncentracích (hodnota 0,075 mg/l). Na základě provedeného

experimentu bylo ovšem zjištěno, že kutikuly z listů meruněk nejsou schopné penetrovat fluorescein o tak nízkých koncentracích, neboť nejnižší naměřenou hodnotou koncentrace bylo 50 mg/l.

Transkutikulární penetrační testy byly realizovány na hliníkové fólii, na kterou byl položen agarózový hydrogel, na který byla položena kutikula. Na tuto přírodní membránu byl nanesen sledovaný roztok o koncentraci 50 mg/l o objemu 20 μ l. Následně bylo připraveno 20 opakujících se vzorků pro každý použitý materiál a ty byly umístěny do inkubátoru při teplotě 25 °C a konstantní vlhkosti.

Na základě výsledků bylo zjištěno, že lipofilní látky penetrují kutikulou lépe než ty hydrofilní, a že tento typ difúzních experimentů závisí na teplotě, pH, lipofilní/hydrofilní povaze vzorku a samozřejmě i na jeho koncentraci.

Sorpci a difúzi C^{14} -atrazinu přes rostlinné kutikuly studoval *Chamel s Vittonem* [19]. Jejich difúzní experimenty byly založeny na dvou skleněných komorách o stejných objemech, mezi něž byla upevněna rostlinná kutikula, a celý systém byl temperován na teplotu 20 °C. Difúzní aparatura byla položena na magnetickou míchačku, aby bylo dosaženo stejných koncentrací v celém prostoru jednotlivých skleněných částí. Jako studovanými roztoky byly využity atrazine-ring- $UL-^{14}C$ a simazine-ring- $UL-^{14}C$, tedy šlo o látky s radioaktivně značeným uhlíkem. Celý experiment byl sledován po dobu 7 dnů, kdy v časových intervalech docházelo k odebírání přijímacího roztoku, u nichž byly zjišťovány radioaktivně značené uhličky (^{14}C).

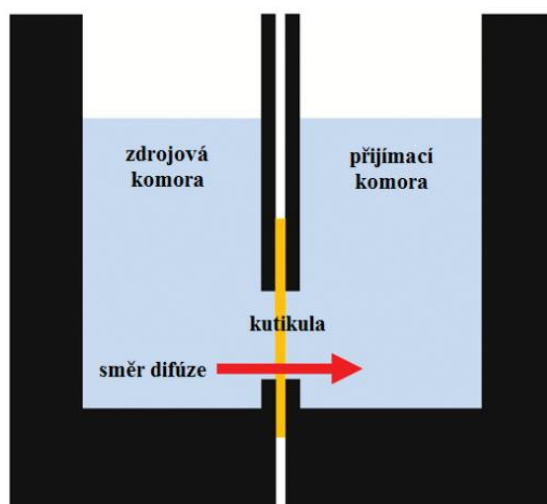
Transport herbicidů prošlého skrze kutikulu byl vyjádřen difundovaným množstvím v závislosti na čase a koeficientem permeability P , který byl získán na základě měřeného toku za ustáleného stavu koncentrací v přijímacích a zdrojových roztocích. Pro výpočet byl využit následující vztah:

$$P = \frac{F}{A} \cdot (c_{don} - c_{rec}), \quad (1)$$

kde P je koeficient permeability v nm/s, F je tok v nmol/s, A je plocha kutikuly v kontaktu s roztokem v nm^2 , c_{don} je koncentrace zdrojového roztoku a c_{rec} je koncentrace přijímacího roztoku v $nmol/nm^3$. Koeficient P určuje míru celkové propustnosti membrány. Z výstupů bylo zjištěno, že kutikuly izolované z plodů rajčat mají vyšší difúzní koeficient, než je tomu v případě listů pepře, což nejspíš nasvědčuje stomatickému a astomatickému charakteru používaných kutikul.

Chamel a Gambonnet [20] se zabývali sorpcí a difúzí ethoxylátovaných stearových alkoholů a ethoxylátových stearátových aminů do a přes izolované rostlinné kutikuly. Pro své experimenty využívali skleněné komory oddělené rostlinou kutikulou a systém byl temperovaný na teplotu 25 °C. Jako studované látky byly využity tritiované ethoxylované stearové aminy (20EOA) a tritiovaný ethoxylový stearový alkohol (20EO), proti růstu mikroorganismů bylo využito 1mM roztoku azidu sodného, který byl přidán k roztoku ethoxylátu. Celý experiment byl založen na sledování změny koncentrace radioaktivně značených vodíků (3H) v přijímací cele. Kompletní měření probíhalo po dobu 13 dnů. Pro stanovení koeficientu permeability P využili stejného matematického modelu jako v předešlé práci [19]. Z jejich experimentů bylo zjištěno, že rychlejšího transportu dosahují alkoholy oproti aminům.

Zeisler-Diehl a spol. [21] se ve svém review rovněž zabývali penetračními vlastnostmi kutikul, avšak se zaměřili na procesy transpirace, které mají obdobný charakter jako foliárně aplikované přípravky na povrchu listů. Kutikulární membránu izolovali z listu neobsahující stomata, jejíž tloušťka dosahovala 2–3 μ m. Kutikula byla poté upevněna mezi dvěma transportními komorami (Obr. 3), kde jedna strana představovala vnější prostředí CM a druhá strana představovala vnitřní prostředí CM. Transport ve vodě rozpustných látek byl studován ve směru z vnitřní strany-ven a ve směru z vnější strany-dovnitř. Jedna komora sloužila jako zdrojová, v níž byla přítomna studovaná látka o maximální koncentraci c a druhá komora sloužila jako přijímací.



Obr. 3 Sestavení transportního zařízení pro studium transportu rozpuštěných plynů přes izolovanou rostlinou kutikulu [21].

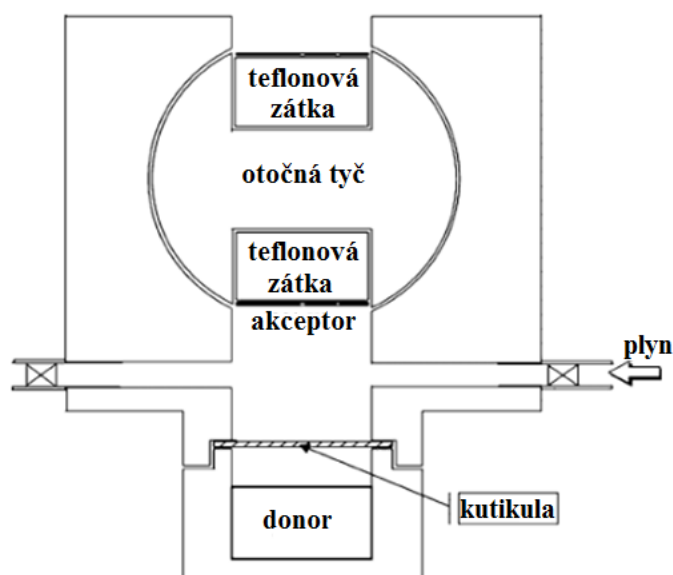
Tento experiment byl rovněž založen na sledování změny koncentrace radioaktivně značených sloučenin, kde pro detekci může být použita jednoduchá analytická nebo fotometrická metoda. Pro studium transpirace rostlinných kutikul je využíváno obdobných experimentálních uspořádání využívajících zdrojovou a přijímací komoru, avšak rozdíl spočívá v tom, že ve zdrojové cele se nachází vodný roztok studované látky a v přijímací cele dochází k odpařování difundované vody. Plyn je poté smíchán s okolní atmosférou reprezentující běžné atmosférické podmínky. Pro takové experimenty je využívána pouze radioaktivně značená voda a výsledky difúze jsou k dispozici během 5–10 minut.

V případě použití vody bez radioaktivního značení je transport studován gravimetrickou metodou, která je časově více náročná (hodiny až dny) a je méně citlivá než metoda radioaktivního značení. Principem této metody je, možnost detekovat ztrátu vody z listů a zároveň i transport radioaktivně značených látek.

Tématikou transpirace kutikul se zabýval i Šantrůček et al. [22], jeho práce je zaměřená na difúzi vody v průtoku plynů helia a dusíku přes stomatální kutikulární membrány izolované z listů břečťanu popínavého (lat. *Hedera helix*). Pro své experimenty rovněž využívaly radioaktivně značenou vodu a speciálně vyvinutou měřicí komoru, jejíž uspořádání je uvedeno na Obr. 4.

Abaxiální a adaxiální kutikuly byly izolovány z listů břečťanu popínavého. Volné polymery vosků byly odstraněny pomocí extrakce založené na 20 ml chloroformu. Listy byly vystaveny tomuto působení po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Měření probíhalo již známou radioaktivně značenou metodou a metodou gravimetrie.

Kutikula byla umístěna mezi obě komory. Zdrojová cela (donor) obsahovala $^3\text{H}_2\text{O}$ a přijímací (akceptor) obsahovala filtrační papír nasycený vodou. Koncentrační gradient $^3\text{H}_2\text{O}$ mezi zdrojovou a přijímací celou je určen hnací silou difúze $^3\text{H}_2\text{O}$ přes membránu. Množství naakumulované radioaktivity v akceptoru v daných časech sloužil pro výpočet permeability vody.



Obř. 4 Schéma komory používané pro měření difúze vypařování vody skřz porézní membránu v různých plynech. Donor reprezentuje radioaktivně značenou vodu $^3\text{H}_2\text{O}$ a akceptor je tvořen z papírového kruhu, který je nasycený vodou bez radioaktivního značení [22].

2.3 Studium vlastností rostlinných kutikul

Difúzní experimenty předložené disertační práce byly realizovány přes izolované rostlinné kutikuly bobkovišně lékařské (lat. *Prunus laurocerasus*), a protože se jedná o hlavní bariéru určující transport látek, bylo nutné tyto tenké bariéry charakterizovat pomocí fyzikálně-chemických metod. Jedním z hlavních cílů práce bylo detekovat rozdíly mezi chemicky a enzymaticky izolovanými kutikulami, a tím odlišit jejich difúzní schopnosti.

Jak již bylo několikrát uvedeno, transport skřze horní a spodní kutikuly je značně odlišný, což je dáno jejich odlišnou strukturou [23], [24]. Vzhledem k tomu, že experimenty v této práci jsou založeny na porovnávání výsledků difúzí realizovaných na chemicky a enzymaticky izolovaných kutikulách, bylo nutné provést studii těchto membrán a zaměřit se zejména na jejich fyzikální a chemickou podstatu, která může významně ovlivňovat transportní procesy.

2.3.1 Vizualizace kutikul metodou skenovací konfokální laserová mikroskopie

Část předložené disertační práce se zabývá studiem struktury rostlinných kutikul a jejich zobrazením různými mikroskopickými technikami (rastrovací elektronová mikroskopie, fluorescenční mikroskopie atd.). *Fernandez et al.* [25] se rovněž zabývali studiem a vizualizací rostlinných kutikul skenovací konfokální laserovou mikroskopií (angl. *Confocal Laser Scanning Microscopy* – CLSM). Jejich práce je založena na sledování fluorescenčních látek obsažených v rostlinných kutikulách, díky nimž mohou zachytit strukturu rostlinných kutikul v 3D prostoru, studovat kutikulární translokaci a difúzi aplikovaných chemikálií či degradaci kutikul.

Rostlinné kutikuly disponují vnitřní fluorescenční emisí označovanou jako autofluorescence, která je způsobena přítomnými flavonoidy a kyselinou skořicovou. Flavonoidy jsou fenolické skupiny o nižší molekulové hmotnosti, které jsou roz distribuované v rostlinném skeletu a hrají významnou roli při interakcích mezi rostlinou a okolním prostředím [26]. V kutině jsou přítomny dva typy flavonoidů tzv. naringenin (tvoří 5–10 hm. %) a chalkonaringenin (tvoří 10–40 hm. %) [27], [28].

Nové mikroskopické techniky, jako je konfokální laserová skenovací mikroskopie, přinesly nové možnosti studia rostlinné tkáně díky přítomným fenolickým skupinám [29]. CLSM technika umožňuje vizualizaci chemikálií a makromolekulárních struktur užívajících speciálních fluorescenčních vlastností na základě jejich molekulárně absorpčního a emisního chování [30].

Schopnost CLSM tvořit 3D snímky je nesmírně důležitou vlastností pro studium rostlinné biologie. Hutzler et al. [31] uvádí, že tato technika umožňuje podávat informaci o subcelulárních fenolických sloučeninách. V tomto článku [25] autoři prezentují 3D snímky rostlinných kutikul izolovaných z různých plodů a listů vykazujících autofluorescenci v kutikulární membráně a rovněž uvádí možnosti využití této techniky pro budoucí aplikace a studium lipofilních membrán, tloušťky, degradace a reaktivity kutikul či pohybu látek v kutikule.

2.3.2 Rastrovací elektronová mikroskopie rostlinných kutikul

Šantrůček et al. [22] se ve své publikaci zabýval novými technikami pro měření vodní permeability stomatických kutikulárních membrán izolovaných z listů *Hedera helix* a jako doplňující techniku využil i rastrovací elektronovou mikroskopii. Pomocí SEM techniky zachytil snímky rostlinných kutikul především pórů stomat. Cílem této metody bylo zjistit rozdíly v otevřenosti pórů stomat před a po extrakci vosků. Ze snímků stanovil velikosti pórů stomat, šířku a délku hrdla stomat.

Cílem této studie bylo podrobit kutikuly měření před a po extrakci kutikulárních vosků. Autoři článku se domnívali, že by mohlo dojít ke změně otevřenosti pórů stomat, což by potom mělo vliv na difúzní experimenty, ale tento předpoklad nebyl potvrzen, neboť extrakce vosků neměla žádný vliv na funkci či otevřenost pórů stomat v rostlinných kutikulách. O tom všem i svědčí tabulka (Tab. 1 **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**), která vystihuje průměrné hodnoty naměřených velikostí šířek a délek hrdla pórů stomat.

Tab. 1 Průměrné hodnoty šířky a délky pórů stomat pro izolované rostlinné kutikulární membrány (CM) a pro kutikuly, u nichž byly extrahovány kutikulární vosky (MX). CI značí 95% koeficient spolehlivosti [22].

		rozměry hrdla kutikuly (μm)	
		šířka	délka
CM	Mean (n=50)	2.28	8.60
	CI	0.32	0.78
MX	Mean (n=50)	2.54	8.50
	CI	0.27	0.64

Rastrovací mikroskopii byly studovány i horní kutikuly, které neobsahují stomata, ale byly zde patrné praskliny, které mohou mít významný vliv v ovlivňování difúzních experimentů.

3 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Disertační práce je koncipována do čtyř hlavních cílů:

První část je zaměřena na studium penetrace lignohumátu draselného (LH) přes rostlinné kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou, studium transportu látek přes abaxiální (spodní) a adaxiální (horní) rostlinné kutikuly izolované z listu bobkovišně lékařské (lat. *Prunus laurocerasus*) a difúzní experimenty studované v závislosti na teplotě. Dále sestavení vhodného matematického modelu popisujícího difúzi přes rostlinné kutikuly a porovnání výsledků transportních experimentů

Druhá část je zaměřena na studium vlastností a charakteru rostlinných kutikul, coby materiálů tvořících nejsvrchnější část povrchu rostlin, a tedy ovlivňující transportní procesy. A rovněž na charakterizaci rostlinných kutikul metodami – infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FT-IR), mikroskopie měření doby života fluorescence (angl. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* – FLIM), klasické optické mikroskopie či fluorescenční mikroskopie, dále izotermické kalorimetrie (angl. *Isothermal Calorimetry* – IMC), rastrovací elektronové mikroskopie (angl. *Scanning Electron Microscopy* – SEM) a mechanické profilometrie.

Třetí část je zaměřena na charakterizaci použitých hydrogelových materiálů, stanovení reologických vlastností používaných hydrogelů (přijímacího i zdrojového) (angl. *Rheometer* – REO) a stanovení velikosti pórů v hydrogelu rtuťovou porozimetrií a rastrovací elektronovou mikroskopií.

Čtvrtá část je zaměřena na realizaci skleníkových experimentů využívajících přípravků obsahujících huminové látky, studium vlivu superabsorbentů obsahujících látky NPK, respektive NPK s lignohumátem draselným a vliv komerčního přípravku Lignohumátu A na výnosnost půdy, růst a kvalitu rostlin. Dále se zaměřuje na stanovení základních fyzikálně-chemických vlastností půd (pH a elektrická vodivost), stanovení množství dusíku v půdě ve formě $[\text{NH}_4^+]\text{-N}$ a $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$. Součástí této kapitoly je realizace inkubačních testů zaměřených na stanovení množství oxidu uhličitého a oxidu dusného v půdách a stanovení pH, elektrické vodivosti a množství dusíku vázaného na minerální formy $[\text{NH}_4^+]\text{-N}$ a $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST I

4.1 Izolace rostlinných kutikul

Pro studium penetrace kapalných přípravků do listů, bylo nutné provést izolaci rostlinné kutikuly. Jedná se o membránu, která tvoří prvotní bariéru mezi listem a vnějším prostředím. Nezbytnou součástí studia penetrace do struktury listů jsou rostlinné kutikuly, protože jsou zodpovědné za výměnu látek a transpiraci rostlin. Pro získání rostlinných kutikul je využíváno dvou metod izolace, chemické a enzymatické.

Na základě dosavadních zkušeností nabytých z publikací [31] a [32] byly zvoleny kutikuly z listů bobkovišně lékařské. Její kutikuly jsou pevné, snadno se s nimi manipuluje při přípravě difúzních experimentů, a při samotném měření.

4.1.1 Chemická metoda izolace kutikul

Chemická metoda využívá drastického izolačního roztoku založeného na rozpuštěném chloridu zinečnatém v koncentrované kyselině chlorovodíkové. Izolace kutikul byla provedena dle postupů uvedených v práci *W. H. Orgella* [1].

Listy bobkovišně lékařské byly ponořeny do čisté vody, aby došlo k očištění jejich povrchu. Poté byly listy zbaveny řapíku, okrajových částí listu, případně i mechanicky poškozených částí. Tím bylo dosaženo bezproblémové separace kutikuly od mezofylu listu v závěrečném kroku izolace. Listy byly vloženy do skleněné nádoby, kde byly uchyceny plastovou mřížkou, aby nedošlo k jejich vyplavení na hladinu a celý jejich povrch byl v kontaktu s izolačním roztokem.

Izolační roztok byl připraven rozpuštěním chloridu zinečnatého v koncentrované kyselině chlorovodíkové tak, aby vznikl 60 hm. % roztok ZnCl_2 . S roztokem muselo být nakládáno nadměru opatrně, kvůli jeho silným korozivním vlastnostem. Nádoba byla opatřena parafilmem jako ochrana proti odpařování vody.

Izolace kutikul probíhala po dobu 3 dnů, po této době byly kutikuly vneseny do Petriho misek s čistou destilovanou vodou a pomocí štětce byly odstraněny zbylé nečistoty. Kutikuly byly několikrát promyty v destilované vodě pro odstranění zbytkových nečistot.

4.1.2 Enzymatická metoda izolace kutikul

Kutikuly bobkovišně lékařské byly rovněž izolovány enzymatickou metodou, které soužily jako srovnávací vzorky s chemicky izolovanými kutikulami. Difúzní experimenty byly realizované jak přes abaxiální, tak adaxiální kutikuly. Pro tento druh izolace se využívají enzymy, celulóza a pektináza, které jsou rozpuštěny v 0,1M citrátovém pufru o pH 3,5. Vzhledem k dlouhému procesu

izolace, se k roztoku přidává 5 obj. % azidu sodného, tak aby jeho výsledná koncentrace v roztoku odpovídala 0,05–0,10 hm. %.

Příprava listů a jejich uchycení ve skleněné nádobě probíhalo stejným způsobem, jako bylo uvedeno v kapitole výše. K listům byl přidán připravený izolační roztok, opět bylo dbáno na dokonalé smáčení povrchů listů. Nádoba byla utěsněna parafilmem a přiklopena skleněným víkem, aby nedocházelo k odpařování roztoku z nádoby.

Izolace rostlinných kutikul probíhala po dobu 6 týdnů. Poté byly kutikuly mechanicky odstraněny pomocí pinzety a štětce. Ve výsledku byly získány transparentní tenké membrány, které byly několikrát promyty v čisté destilované vodě.

Během práce s rostlinnými kutikulami, byly postupy izolace postupně optimalizovány, aby došlo ke zkrácení celého procesu. V takovém případě je nutné docílit efektivnější práce enzymů, čemuž odpovídá teplota 35–40 °C. Pokud je nádoba s listy a roztokem vnesena do temperační komory při teplotě 35 °C, potom dojde ke zkrácení procesu izolace o 3–4 týdny, dále záleží na druhu listu, ze kterého jsou kutikuly izolovány. Postup optimalizace izolace kutikul je zmíněn v publikaci [33].

4.2 Charakterizace rostlinných kutikul

Izolace rostlinných kutikul probíhala dvěma odlišnými metodami (chemicky a enzymaticky). Z dostupných materiálů [33]–[35] bylo zjištěno, že izolační metoda má vliv na funkci kutikul, a tudíž i na difúzní experimenty. Z těchto důvodů bylo nutné kutikuly detailně analyzovat mikroskopickými metodami, jako jsou mikroskopie doby života fluorescence, rastrovací elektronová mikroskopie a méně náročnými metodami, jako jsou optická mikroskopie a fluorescenční mikroskopie nebo mechanická.

4.2.1 Příprava vzorků pro optickou mikroskopii

Bobkovišeň lékařská je okrasný keř, jehož kutikuly z horní (adaxiální) strany jsou tvořeny pouze pletivovou sítí a kutikuly ze spodní (abaxiální) strany jsou navíc tvořeny stomaty zodpovědnými zejména za transpiraci a transport látek.

Rostlinné kutikuly byly rozděleny na horní a spodní za pomoci optického mikroskopu. Kutikuly byly v mokřém stavu položeny na podložní sklíčka, kde byly štětcem rozprostřeny po celém povrchu skla, a poté byly přikryty krycím sklíčkem. Následně byly všechny kutikuly prohlédnuty pod optickým mikroskopem (Olympus IX) a byly rozřazeny dle své struktury do skupin. Rovněž byla studována možná mechanická poškození, v takovém případě byly kutikuly vyloučeny z řad vhodných adeptů pro navazující difúzní experimenty. Pro měření vzorků kutikul metodou optické mikroskopie byla použita optika s šedesátinásobným zvětšením.

Pro důkladné prostudování struktury optickou mikroskopii bylo nutné kutikuly dobře rozprostřít na podložní sklíčko, a poté je vysušit v sušárně při teplotě 25–30 °C. Důležité bylo, aby kutikuly neobsahovaly žádné vzduchové bubliny, které by mohly zkreslit nebo úplně znemožnit mikroskopické pozorování. Pro zobrazení vzorků byl použit objektiv s 60násobným zvětšením.

4.2.2 Příprava vzorků pro rastrovací elektronovou mikroskopii (SEM)

Rostlinné kutikuly byly rovněž podrobeny detailnímu měření na rastrovacím elektronovém mikroskopu, čímž byla získána jejich bližší charakterizace z hlediska jejich struktury a povrchu. Kutikuly byly izolovány, dobře očištěny a rozděleny na adaxiální a abaxiální kutikuly optickým mikroskopem. Následně byly kutikuly rozprostřeny štětcem na analytická mikrosklíčka.

Kutikuly byly nanášeny na mikrosklíčko ze strany odstraňování mezofylu (dále v textu zmiňováno jako vnitřní strana) a ze strany, kde k odstraňování nedochází, tedy ze strany kutikuly, která je v kontaktu se vzduchem (dále v textu zmiňováno jako vnější strana). Tímto způsobem byly studovány jednotlivé odlišnosti mezi oběma povrchy jednoho druhu kutikuly. Celkem bylo připraveno 8 vzorků

rostlinných kutikul, které byly ponechány k vysušení po dobu 24 hodin za laboratorní teploty, případně bylo využito sušárny při nastavení teploty do 30 °C.

Následující den byly kutikuly upevněny na uhlíkové černé pásky mosazného držáku tak, aby nebyly pokrčené. Poté následoval krok povrchové úpravy vzorku a to pozlacením. Parametry nastavení SEM byly následující: proud odpovídal 80 pA, napětí 10 kV a pracovní vzdálenost 9 mm. Snímky byly pořízeny na základě sekundárně odražených elektronů.

4.2.3 Příprava vzorků pro mechanickou profilometrii

Rostlinné kutikuly byly podrobeny měření na mechanickém profilometru (Dekta kXT, Bruker), čímž byla změřena tloušťka membrán a jejich profil, respektive heterogenita povrchu. Na základě této metody bylo rovněž možné posoudit rozdíly mezi chemicky a enzymaticky izolovanými kutikulami, což může opět hrát důležitou roli při porovnávání difúzních experimentů.

Vzorky byly připraveny následujícím způsobem, izolovaná rostlinná kutikula byla dobře promyta vodou, a poté byla nanášena na podložní mikrosklíčko tak, aby byla dokonale napnutá a nedošlo k vytvoření vzduchových bublin. Na jedno mikrosklíčko byly nanášeny 3 kutikuly stejného typu, které byly následně vysušeny za laboratorní teploty. Nastavení parametrů mechanického profilometru bylo následující: typ stylusu odpovídal 12,5 µm, přítlak stylusu byl 0,5 mg a rozlišení odpovídalo 0,083 µm/pt.

4.3 Příprava difúzních experimentů

Difúzní experimenty jsou založeny na jednoduchých difúzních metodách, a to metodách stacionární a nestacionární difúze, k čemuž bylo použito PMMA kyvet naplněných agarózovým hydrogely a rostlinných kutikul izolovaných z listů *Prunus laurocerasus*.

4.3.1 Difúze z roztoku

Difúze z roztoku je založena na přijímacím agarózovém hydrogelu s obsahem 1 hm. % agarózy a izolované rostlinné kutikule. Ta byla pevně přichycena parafilmem na přijímací hydrogel a byla dobře izolována, aby nedošlo k obtékání kapaliny kolem ní, čímž by došlo k ovlivnění výsledků.

Takto připravené hydrogelové matrice s kutikulami byly vloženy do nádoby s 1 hm. % roztokem Lignohumátu A. Celkem bylo připraveno 5 nádob, do kterých byl připraven vždy stejný objem vodného roztoku LH, tedy 200 ml, a ten byl při experimentech stále míchán při 230 ot./min. Do nádoby bylo umístěno vždy 5 stejných kyvet s upevněnou kutikulou, tedy celkem bylo připraveno 15 vzorků kyvet pro každý typ kutikuly. Experimenty byly provedeny jak pro chemicky, tak enzymaticky izolované kutikuly, pro adaxiální i abaxiální stranu. Experimenty byly realizovány při teplotě 25 °C.

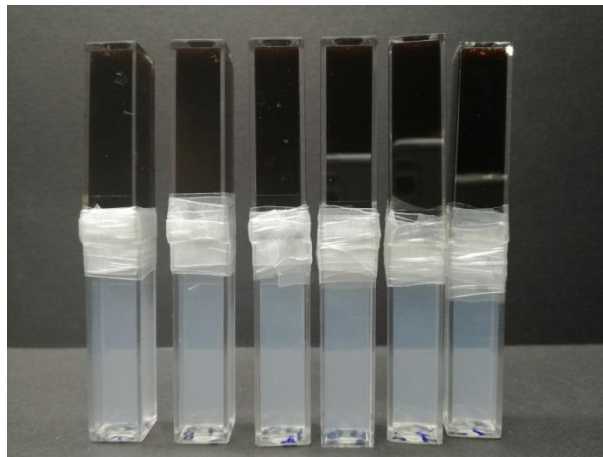
Tento počet nádob a kyvet byl stanoven z důvodu opakovatelnosti experimentu, a tedy i jeho statistickému vyhodnocení. Experimenty byly měřeny maximálně po dobu 3 dnů, protože po této době byla koncentrace nejen na rozhraní (hydrogel s kutikulou/roztok), ale i dále v kyvetě natolik vysoká, že již nebylo možné UV-VIS spektra v těchto místech v dalších dnech naměřit.

Měření tedy probíhalo po dobu 3 dnů na UV-VIS spektrometru Varian Cary 50. Pro měření byl využit speciální posuvný nástavec na kyvety, díky němuž bylo možné měřit koncentrační profily, tedy změnu koncentrace lignohumátu draselného se vzdáleností od rozhraní (hydrogel/kutikula) a zároveň i v závislosti na čase. Prvních 5 mm kyvety byly spektra měřeny po kroku 1 mm, pak byl krok změněn na 2 mm, čímž byla proměřena celá kyveta.

4.3.2 Difúze ze zdrojového hydrogelu

Difúze ze zdrojového hydrogelu je založena na dvou kyvetách vyplněných hydrogely, zdrojovým a přijímacím. Zdrojový hydrogel zpravidla obsahuje 1 hm. % agarózy a 1 hm. % lignohumátu draselného, naopak přijímací hydrogel je tvořen pouze z 1 hm. % agarózy.

Na zdrojový hydrogel byla upevněna rostlinná kutikula, k tomu bylo využito parafilmové folie. K připravené zdrojové kyvetě s kutikulou byl parafilmem připevněn i přijímací hydrogel. Difúzní páry (Obr. 5) byly dány do polystyrénového držáku a byly vloženy do exikátoru s vodou, aby bylo docíleno konstantních podmínek (100% vlhkost, konstantní teplota). Tím bylo zamezeno vysychání kutikul a hydrogelů, což by mohlo výrazně ovlivnit výsledky měření. Experimenty byly provedeny pro oba typy kutikul izolovaných chemicky i enzymaticky. Difúzní experimenty probíhaly při třech teplotách 25, 35 a 45 °C.



Obr. 5 Ukázka přípravy difúzního páru.

Měření experimentů probíhalo obdobným způsobem, jako tomu bylo v případě volné difúze, přijímací kyveta byla odňata od zdrojové kyvety, byla provedena kontrola kutikuly, zda nedošlo k jejímu poškození, což by ovlivňovalo výsledky transportů. Přijímací cela byla dána do posuvného nástavce a UV-VIS spektra byla měřena v následujících vzdálenostech od rozhraní kyvety (hydrogel/kutikula). V prvních 5 mm byla kyveta měřena po kroku 1 mm, poté po kroku 2 mm až po konec kyvety.

Výsledkem měření byly koncentrační profily, tedy změna koncentrace studovaného materiálu se vzdáleností od rozhraní (hydrogel/kutikula) a rovněž i v závislosti na čase. Experimenty byly měřeny po dobu 14 dnů.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST II

5.1 Úvod k experimentální části II

Druhá část disertační práce je zaměřena na aplikace pevných substrátů (NPK, lignohumát draselný a supersorbent) do půdy. V rámci těchto experimentů byly sledovány fyziologické změny (vzrůst rostliny, zbarvení listů apod.) a zároveň byla sledována kondice půdního substrátu (obsah dusíku, fosforu a oxidu uhličitého).

Tyto znalosti nabyté v rámci mezinárodního pobytu na Monash University, Australia budou dále využity k dalšímu výzkumu foliárního hnojení na FCH VUT v Brně. Jejich aplikací budeme schopni posuzovat vlastnosti foliárního hnojení i z hlediska fyziologických změn rostlin, a protože foliární hnojení částečně působí i na půdu, tedy studovat i kondici a změny látek v půdě.

5.2 Příprava květináčů a nastavení podmínek experimentů

Pro rostliny jako je ředkvička, hlávkový salát a špenát bylo nutné zvolit květináče o průměru 16 cm a výšce 25 cm. Květináče byly dobře omyty vodou a byly ponechány k usušení, po vyschnutí byla spodní část květináče zalepena papírovou páskou, aby nedošlo k propadávání půdy či odvádění vody z nádoby. Květináče bylo rovněž nutné vhodně označit.

Následně bylo možné naplnit květináče hlínou a zasít semena rostlin. Do každého květináče bylo naváženo 1,8 kg půdy, v každém květináči byla rozptýlena stejná koncentrace aplikovaných látek, tedy lignohumátu A, NPK a SAPs. Rovněž byly všechny květináče zality stejným množstvím vody, vodní kapacita CB půdy odpovídala 70 hm. %.

Vzhledem k omezenému množství superabsorbentů byla zvolena koncentrace 1 g SAPs na 250 g půdy. Xerogely s NPK a LH obsahovaly 1,2 hm. % NPK a 1,8 hm. % LH. Na základě těchto parametrů byla připravena druhá sada vzorků, která obsahovala pouze xerogel s NPK o koncentraci 1,2 hm. % NPK. Do posledních dvou typů experimentů, půda s obsahem LH a NPK a kontrolní sada vzorků obsahující pouze NPK, byly zvoleny shodné koncentrace obou použitých látek NPK a LH, jako tomu bylo u SAPs s NPK a LH. Experimenty byly zvoleny tímto způsobem, aby bylo možné porovnat SAPs s práškovými (NPK), respektive kapalnými (LH) formami přípravků a pozorovat jejich vlivy na rostliny. Superabsorbenty byly rozemlety na prach pomocí elektrického mlýnku, rovněž tak i granule NPK. Určitě je nutné zmínit, že přípravek lignohumát A nebyl použit dle návodu výrobce (doporučené koncentrace), což mohlo významně ovlivnit výsledek výnosu rostlin a průběhu celého experimentu.

Do květináče byla přidána voda, tak aby odpovídala 70 hm. % vodní kapacity, do vlhké půdy bylo zaseto vždy 10 semínek z jedné rostliny. Květináče byly na závěr zváženy a jejich celkové hmotnosti byly zaznamenány, aby bylo možné na základě úbytku hmotnosti doplnit vodu do původní hmotnosti.

Ve skleníku byly nastaveny tyto podmínky: teplota stolu odpovídala 25 °C, teplota vzduchu 23±2 °C, vlhkost vzduchu byla 100% a světlo odpovídala 4,8–5,9 kLux. Podmínky byly řízeny centrálním počítačem v technické místnosti, technika pravidelně zaznamenávala měnící se hodnoty ve skleníku, v případě velkých výkyvů automaticky řídila ohřívání, respektive ochlazování vzduchu ve skleníku, teplotu stolu, vlhkost apod. Za výše uvedených podmínek byly rostliny pěstovány po dobu 8 týdnů. Každý druhý den byly květináče váženy a byla k nim přidávána voda podle úbytku hmotnosti. Na základě těchto měření bylo možné stanovit, zda SAPs mají vliv na lepší zadržování vody či nikoliv.

Po 14 dnech došlo k jednocení rostlin a vybrání pouze jediného reprezentanta, který byl ponechán k dalšímu růstu a byl zvolen pro finální zhodnocení. Toto zhodnocení probíhalo po 2 měsících od zasetí. Zpravidla platí, že tento typ experimentů je ukončen až po úplném vzrůstu a vývoji zasetých rostlin. Ovšem s končícím pobytem na Monash University a časově náročnými dalšími analýzami bylo nezbytné experimenty přerušit, i přesto, že vzorky s obsahem NPK a LH, respektive kontrolní vzorky s NPK nebyly plně vyvinuty.

5.3 Stanovování NO_3^- -N, NH_4^+ -N a Colwell P v půdě

Extrakce půdy

Pro stanovení dusíku a fosforu v půdě bylo nezbytné nejdříve vzorky půd extrahovat. Extrakce byla založena na vyluhování vzorků půd v roztoku 2M chloridu draselném (KCl). Do 50 ml centrifugačních zkumavek bylo naváženo 10 g z každého vzorku půdy, který byl dále suspendován 25 ml připraveného roztoku KCl. Zkumavky byly třepány na třepačce přes noc a následující den bylo provedeno odstředování vzorků v centrifuze (Termo Fischer Science, model 6890). Vzorky byly odstředovány za následujících podmínek 4 500 ot./min. po dobu 5 minut. Po odstředění byly vzorky zfiltrány přes filtrační papír do nových 25 ml plastových zkumavek, které byly pečlivě označeny číslem vzorku. Vzorky byly využity pro další analýzy nebo byly ihned zamrazeny, aby nedocházelo k jejich znehodnocování.

Stanovení NO_3^- -N obsaženého v extraktu půdy

Obsah dusíku vázaného na dusitanové anionty bylo možné stanovit z extraktu vzorků 2M KCl. Pozitivní zjištění dusíku v půdě v podobě NO_3^- -N se projevuje růžovým zbarvením chemické reakce,

u vzorků byly změřena UV-VIS spektra za pomoci UV-VIS spektrometru (Termo Fischer Science, Multiscan Go). Z naměřených hodnot byly stanoveny koncentrace dusíku ve vzorcích.

Aby k takové reakci mohlo dojít, muselo být využito následujících reakčních roztoků a postupů. Nejdříve bylo nutné připravit reakční **roztok č. 1**. Do 125 ml nádoby obalené hliníkovou folií bylo nasypáno 0,4 g chloridu vanaditého a k němu byla přidána 1M kyselina chlorovodíková. Láhev byla nejdříve ručně protřepána, poté uzavřena a ponechána k rozpuštění a ke zchlazení po dobu 10 minut. Během té doby byl připraven reakční **roztok č. 2**. Do 500 ml nádoby opět obalené alumíniovou folií bylo nasypáno 0,2 g sulfanilamidu a 0,01 g NED (N-(1-naphtyl-ethylenediamine dihydrochloride). Obě složky byly rozpuštěny ve 400 ml ultračisté vody. Po přípravě obou reakčních roztoků bylo provedeno jejich smíchání v poměru 1:8 do nové nádoby obalené hliníkovou folií, tím vznikl výsledný reakční roztok (reagent).

Tab. 2 Referenční hodnoty pro přípravu vzorku v očekávaném koncentračním rozmezí $\text{NO}_3^- - \text{N}$.

$\text{NO}_3^- - \text{N}$ (ppm)	objem vzorku (μl)	objem reagentu (μl)
<1	150	150
1–5	25	275
1–10	13	287
1–20	6	295
1–50	2,5	299

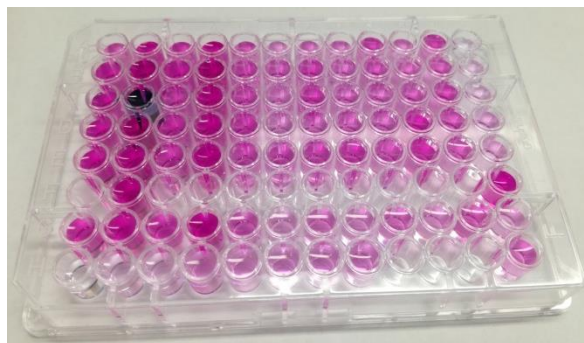
Roztok po extrakci půd byl poté pipetovány do mikrodětiček určených pro měření UV-VIS spektrometrie a k nim byl přidán reakční roztok. Objem roztoku vzorků a reagentu byl navržen podle tabulky (Tab. 2).

Rovněž byla připravena kalibrační řada, díky níž bylo možné stanovit koncentrace dusíku v jednotlivých vzorcích. Pro kalibrační řadu bylo využito standardního roztoku $\text{NO}_3^- - \text{N}$ od Sigmy-Aldrich. Pro analýzu bylo využito 200 μl standardu a 1 800 μl 2M KCl, čímž vznikl roztok o koncentraci 100 μg NO_3^- na 1 ml 2M KCl. Tento standardní roztok byl následně použit pro přípravu kalibrační řady, která byla připravena do plastových nádobek v poměrech uvedených v tabulce (Tab. 3).

Tab. 3 Příprava koncentrační řady $\text{NO}_3^- - \text{N}$ standardu.

Standard $\text{NO}_3^- - \text{N}$	Objem 100 ppm roztoku (μl)	Objem 2M KCl (μl)
0	0	1 000
4	40	960
6	60	940
8	80	920
10	100	900
12	120	880
14	140	860
16	160	840
20	200	800
24	240	760

Po přípravě bylo 13 μl od každé koncentrace pipetováno do mikrodestiček a k nim bylo přidáno 287 μl reagentu. Celkem byly připraveny 2 koncentrační řady, jejichž hodnoty absorbancí byly po měření zprůměrovány a na základě lineární regrese byly vypočteny koncentrace $\text{NO}_3^- - \text{N}$ pro reálné vzorky. Po přípravě všech vzorků byly mikrodestičky přiklopeny víkem, označeny popisem a dány do digestoře. Reakce probíhala po dobu 16 hodin, kdy vzorky se zbarvily do růžova (Obr. 6), a poté byly změřeny na UV-VIS spektrofotometru (Thermo Fischer Science, Multiscan Go) pro vlnovou délku 540 nm.



Obr. 6 Příklad pozitivní reakce na dusík vázaný přes dusičnanový anion.

Stanovení $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ obsaženého v extraktu půdy

Pro stanovení $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ ve vzorcích půdy je zapotřebí rovněž extrahovaných vzorků půdy. Pozitivní reakce pro stanovení $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ se projeví azurově modrým zbarvením vzorků. Pro analýzu byly připraveny dva typy reakčních roztoků, první z nich byl označen jako **reagent A**. Do skleněné nádoby obalené hliníkovou folií bylo odměřeno 100 ml destilované vody, 6,5 g salicylátu sodného, 5 g citrátu sodného, 5 g dihydrátu vlnanu sodného a 0,025 g nitroprussidu sodného. Všechny složky byly ve vodě rozpuštěny a láhev byla dána do lednice. Do stejné láhve obalené alumíniovou folií byl připraven **reagent B**, který obsahoval 100 ml destilované vody, 6 g hydroxidu draselného a 2,4 ml bělidla respektive 4% hypochloridu sodného. Láhev byla rovněž dána do lednice.

Pro tato měření bylo nutné připravit rovněž koncentrační řadu ze standardního roztoku $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ zakoupeného od firmy Sigma-Aldrich. Tento roztok byl naředěn tak, aby jeho koncentrace odpovídala 50 $\mu\text{g NH}_4^+$ na 1 ml 2M KCl, tedy k 200 μl standardu bylo nutné přidat 3 800 μl 2M KCl. Kalibrační řady byly připravovány do 3 ml plastových nádobek. Koncentrační řada byla připravena dle uvedené tabulky níže (Tab. 4).

Tab. 4 Příprava koncentrační řady $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ standardu.

Standard $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ (ppm)	objem 50 ppm roztoku (μl)	objem 2M KCl (μl)
0	0	1 000
1	20	960
2	40	940
4	80	920
5	100	900
6	120	880
8	160	840
10	200	800

12	240	760
15	300	700
20	400	600

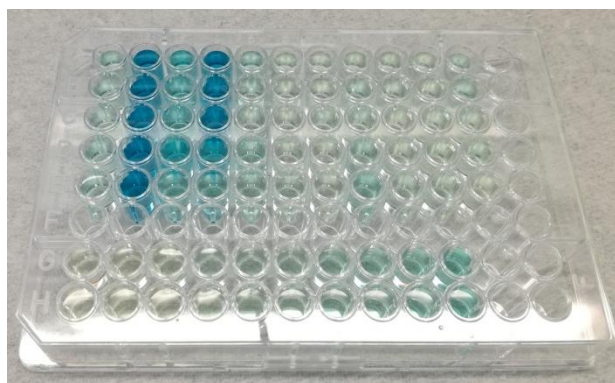
Připravené roztoky koncentrační řady a reálných vzorků mohly být použity pro $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ analýzu. Pro tuto reakci bylo důležité dodržet následujícího postupu, respektive poměry jednotlivých reakčních roztoků a připravených vzorků, respektive kalibračních roztoků. Poměry, podle kterých byly roztoky do mikrodestiček pipetovány, byly zvoleny na základě tabulky (Tab. 5). Na základě zkušeností byl vybrán poměr odpovídající 0–10 ppm $\text{NH}_4^+ - \text{N}$.

Tab. 5 Referenční hodnoty pro přípravu vzorku v očekávaném koncentračním rozmezí $\text{NH}_4^+ - \text{N}$.

$\text{NH}_4^+ - \text{N}$ (ppm)	Objem reagentu 1 (μl)	Objem vzorku (μl)	Objem reagentu 2 (μl)
<1	50	200	50
0–5	127	45	127
0–10	140	22	140
0–20	140	11	140

Připravené vzorky byly přikryty víkem, označeny a dány do digestoře. Vzorky byly takto ponechány po dobu 1 hodiny, poté byly proměřeny na UV-VIS spektrofotometru (Thermo Fischer Science, Multiscan Go) při vlnové délce 650 nm. Vzorky nesměly být změřeny po uplynutí doby delší než 3 hodiny, pak hrozí riziko velkého zkreslení výsledků.

Na obrázku (Obr. 7) je znázorněna mikrodestička s připravenými vzorky, v posledních dvou řadách G a H se nachází vzorky kalibrační řady. U reálných vzorků, druhého a čtvrtého sloupce, je zřejmé, že koncentrace $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ jsou příliš vysoké (syté zabarvení reakce), proto bylo nutné tyto vzorky vhodně naředit dle výše uvedené tabulky (Tab. 5).



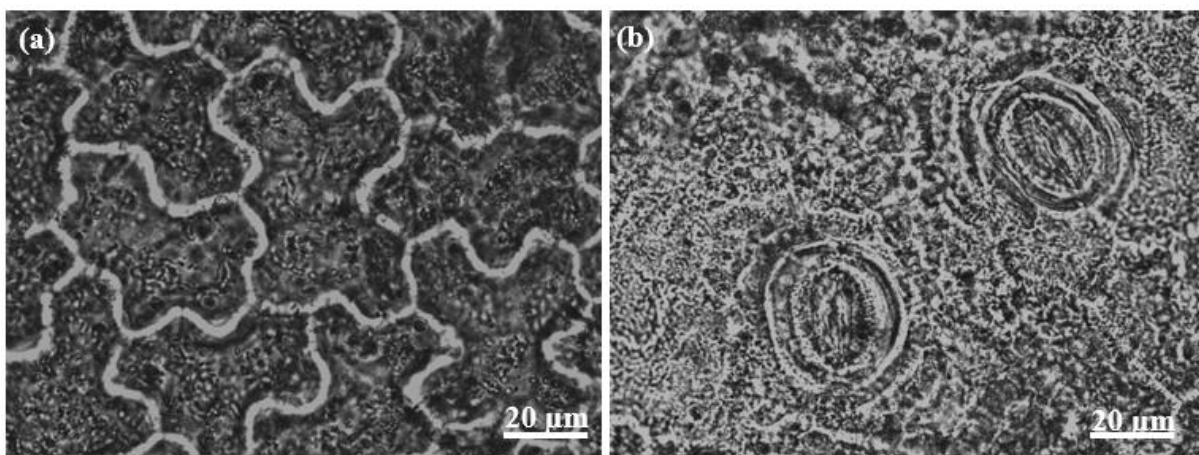
Obr. 7 Příklad pozitivní reakce na dusík vázaný pře amonný kationt.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE – EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST I

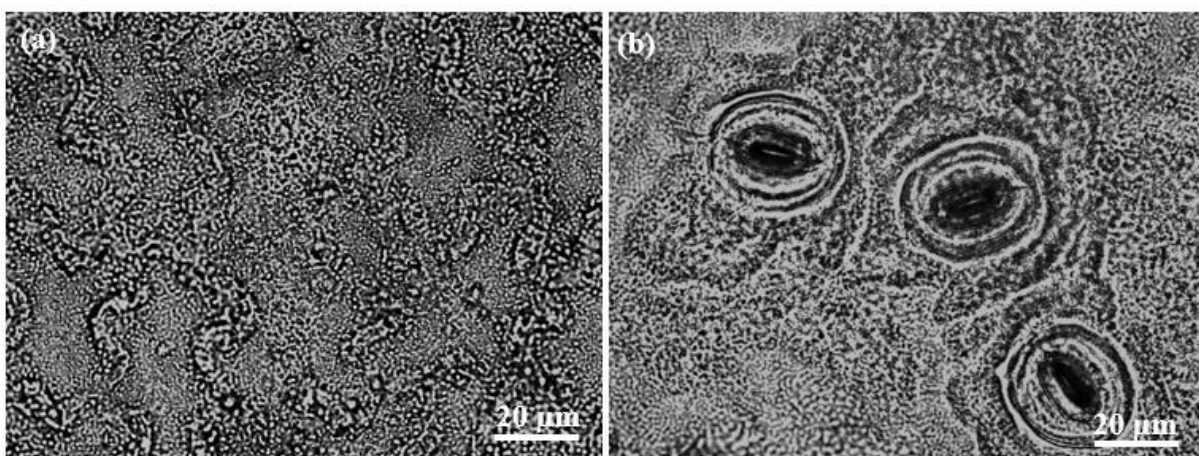
6.1 Charakterizace rostlinných kutikul

6.1.1 Optická mikroskopie

Optická mikroskopie byla prováděna na mikroskopu Nikon Eclips Ci, který sloužil k základnímu rozřazení kutikul na dva typy (horní, spodní). Naopak detailnější měření kutikul byla realizována na mikroskopu Olympus IX71. Na základě vytvořených snímků bylo provedeno zhodnocení rozdílů mezi adaxiální a abaxiální stranou kutikuly a rovněž mezi kutikulami izolovanými chemickou (Obr. 8) a enzymatickou metodou (Obr. 9).



Obr. 8 Snímky z optického mikroskopu pro adaxiální (a) a abaxiální (b) kutikulu izolovanou chemickou metodou. Snímky byly pořízeny při 60násobném zvětšení.

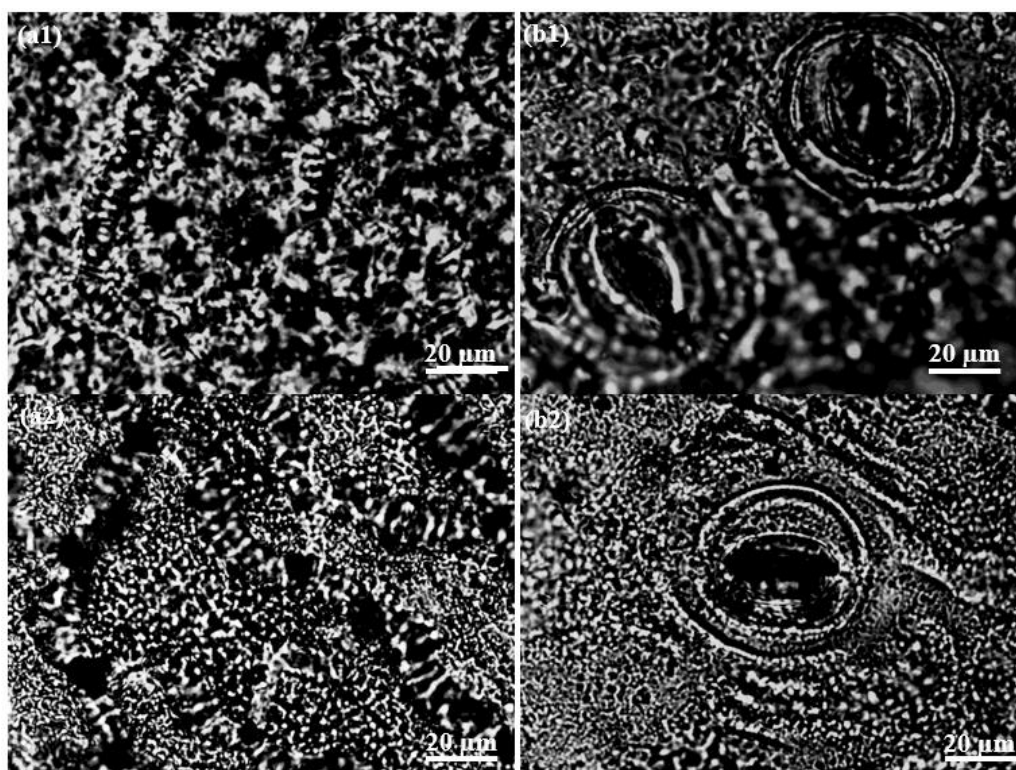


Obr. 9 Snímky z optického mikroskopu pro adaxiální (a) a abaxiální stranu (b) kutikuly izolovanou enzymatickou metodou. Snímky byly pořízeny při 60násobném zvětšení.

Na základě mikroskopických snímků lze rozpoznat rozdíl mezi horní a spodní stranou kutikuly. Horní je tvořena sítí pletiv (snímky označené (a)), spodní je tvořená jak pletivy, tak stomaty, které se vyznačují jako kruhové útvary s prázdnou dutinou (snímky označené (b)). Optický mikroskop byl rovněž použit pro sledování nečistot na povrchu kutikul, které zde zůstaly po odstranění mezofylu. Snímky pořízené optikou 60násobného zvětšení ovšem nepoukázaly na rozdíly v povrchu jednotlivě izolovaných kutikul.

Pro detailní charakterizaci povrchu kutikul bylo provedeno měření při 100násobném zvětšení, díky němuž se potvrdilo, že povrch chemicky a enzymaticky izolovaných kutikul je odlišný. Chemicky izolované kutikuly mají povrch více členitý, tvořený z větších částic podílejících se a tvorbě kutikuly

(Obr. 10 a, b1), naopak enzymaticky izolované kutikuly se jeví víc kompaktní, tvořené z malých částicových struktur (Obr. 10 a2, b2).



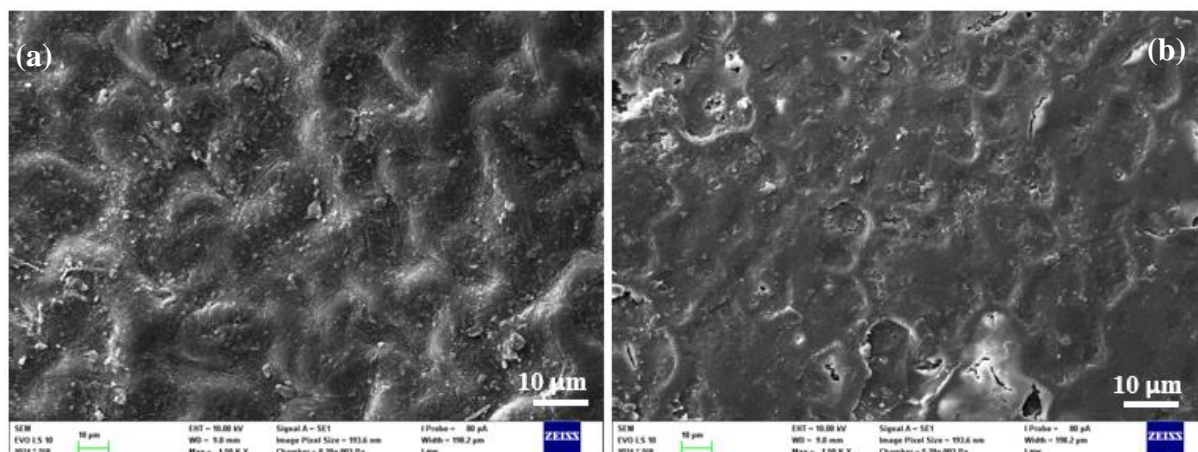
Obr. 10 Snímky z optického mikroskopu při 100násobném zvětšení. Chemicky izolované kutikuly – adaxiální (a1), abaxiální (b1). Enzymaticky izolované kutikuly – adaxiální (a2), abaxiální (b2).

Díky optické mikroskopii bylo možné rozpoznat některé důležité rozdíly ve stavbě a povrchu kutikul, ovšem pro detailnější zobrazení povrchu ze strany odstraňování mezofylu a ze strany od strany ze vzduchu nebyly pozorovány žádné rozdíly. Navíc, nebylo možné spolehlivě rozpoznat místa zanesená zbytky mezofylu. Z tohoto důvodu bylo nutné kutikuly podrobit dalšímu měření například na fluorescenčním mikroskopu nebo rastrovacím elektronovém mikroskopu.

6.1.2 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

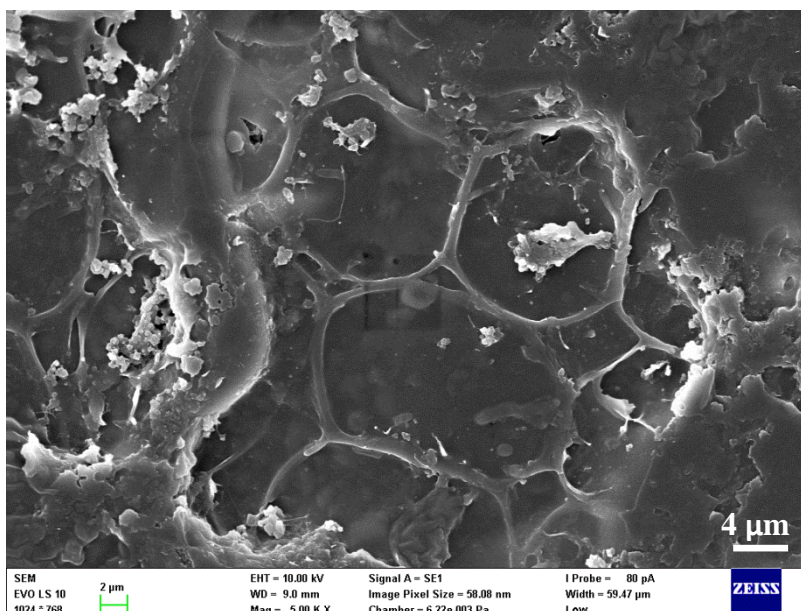
Rastrovací elektronová mikroskopie byla využita z důvodu detailního zkoumání povrchu kutikul. Na základě získaných snímků bylo možné posoudit, jak výrazně se od sebe kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou odlišují, respektive zda vůbec nějaké rozdíly budou pozorovány. Rovněž bylo nutné zjistit rozdíly v rámci jedné kutikuly, tedy ze strany izolace a ze strany vzduchu.

Ačkoli se na optickém mikroskopu struktura kutikul (chemicky a enzymaticky izolovaných) a vlastně celý jejich povrch jevil velmi podobný, ze snímků pořízených ze SEM je zřejmé, že metoda izolace má významný vliv na strukturu kutikul, což má i významný dopad na navazující experimenty. Z Obr. 11a je zřejmé, že kutikula z vnější strany, kde nedochází k odstraňování mezofylu, má kompaktní strukturu s viditelnými pletivy na povrchu. Dále jsou zde patrné malé nečistoty, které mohly ulpět na povrchu kutikul při procesu izolace a nedokonalým omytím povrchu vodou. Na snímku (Obr. 11b) se povrch jeví uceleně jen s mírnými znaky reliéfu pletiv. Vzhledem k tomu, že oba snímky jsou pořízeny při stejném zvětšení, je zřejmé, že jsou tyto povrchy odlišné. A právě na obrázku (Obr. 11b) je zachycena vrstva nedokonale odstraněných polymerů



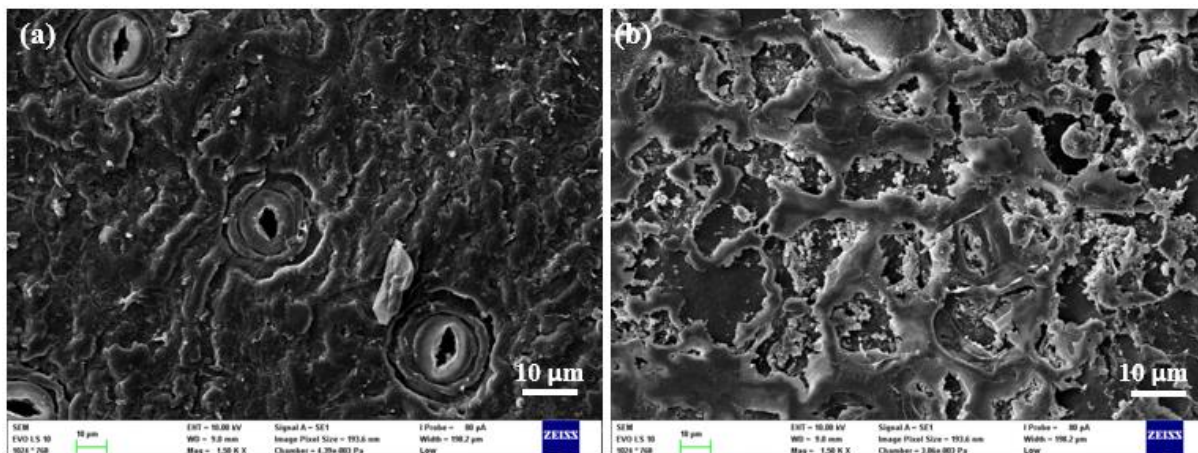
Obr. 11 Snímky ze SEM pro horní stranu kutikul izolované chemickou metodou izolace. Vlevo se nachází snímek kutikuly ze strany vzduchu (a), napravo se nachází snímek ze strany odstraněného mezofylu (b). Snímky byly pořízeny při 1 500násobném zvětšení.

. Na snímku (Obr. 12) je detailně zachycena adaxiální kutikula izolovaná chemickou metodou, kde jsou zřejmé „vyleptané díry“, které vytváří nehomogenní povrch kutikuly. Jedná se již o zmíněnou neodstraněnou vrstvu polymerů.



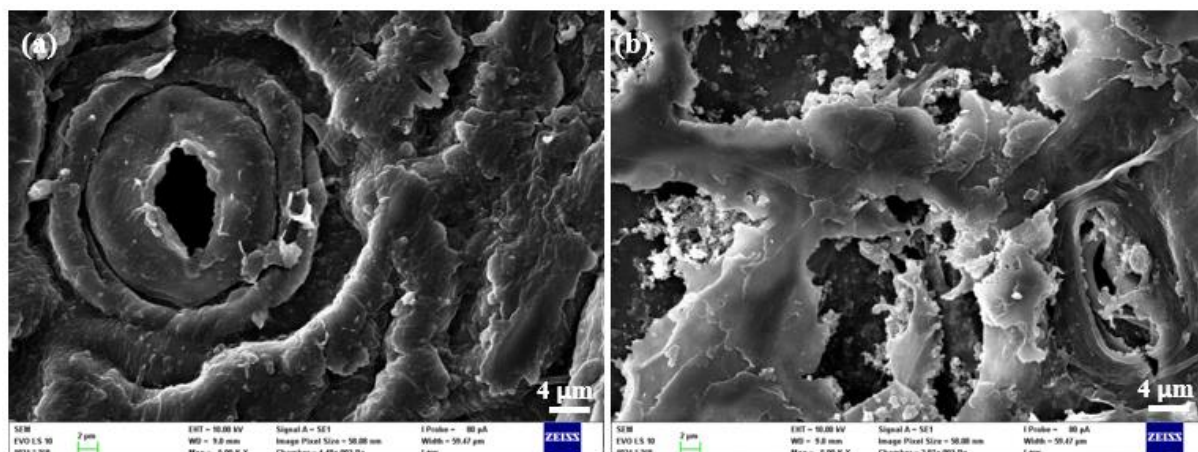
Obr. 12 Detail horní kutikuly izolované chemickou metodou. Snímek pořízený při 5 000násobném zvětšení.

Obdobné rozdíly byly také pozorovány pro spodní stranu kutikuly (Obr. 13). Vnější strana kutikuly (Obr. 13a) byla kompaktní bez vzniku nehomogenit, pouze obsahovala některé malé nečistoty, které ulpěly na povrchu kutikuly při nedokonalém promytí pod proudem vody. Ze strany odstraňování mezofylu (Obr. 13b) byly tyto zbytky pozorovány po celém povrchu kutikuly, opět šlo o neodstraněné polysacharidy, které tak zapříčiňují vznik vrstvy ovlivňující difúzní experimenty.



Obr. 13 Snímky ze SEM pro horní stranu kutikul izolované enzymatickou metodou izolace. Vlevo se nachází snímek kutikuly ze strany vzduchu (a), napravo se nachází snímek ze strany odstraňování mezofylu (b). Snímky byly pořízeny při 1 500násobném zvětšení.

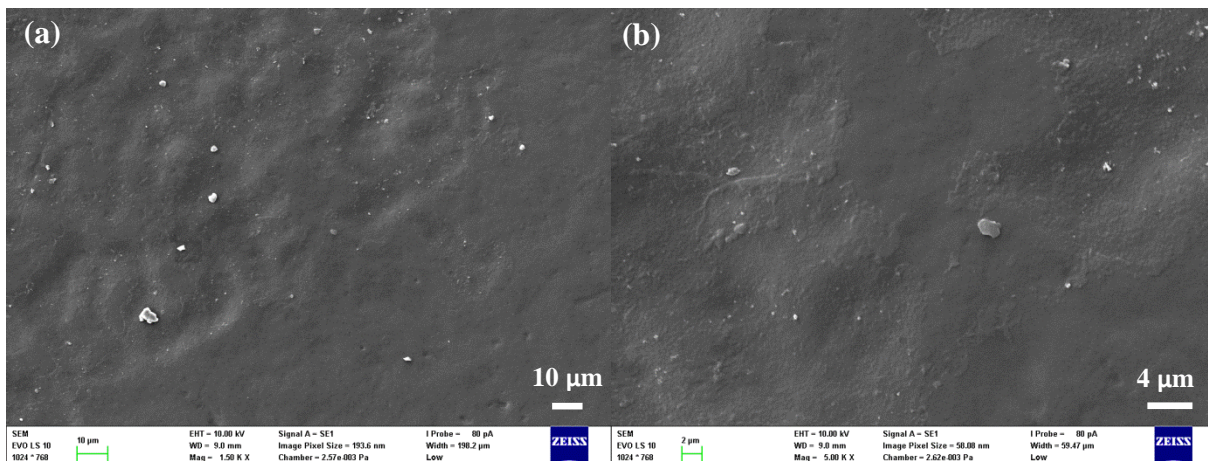
Pro abaxiální kutikuly byly pořízeny i detailní snímky stomat (Obr. 14), z vnější strany nejsou stomata ničím bráněna, ale z vnitřní strany se zde objevují neodstraněné zbytky polymerů, které nebyly úplně rozpuštěny v izolačním roztoku koncentrované kyseliny chlorovodíkové a chloridu zinečnatého.



Obr. 14 Detailní snímek abaxiální strany kutikuly izolované chemickou metodou. Vnější strana kutikuly (a), strana kutikuly odstraňování mezofylu (b). Snímek pořízený při 5 000násobném zvětšení.

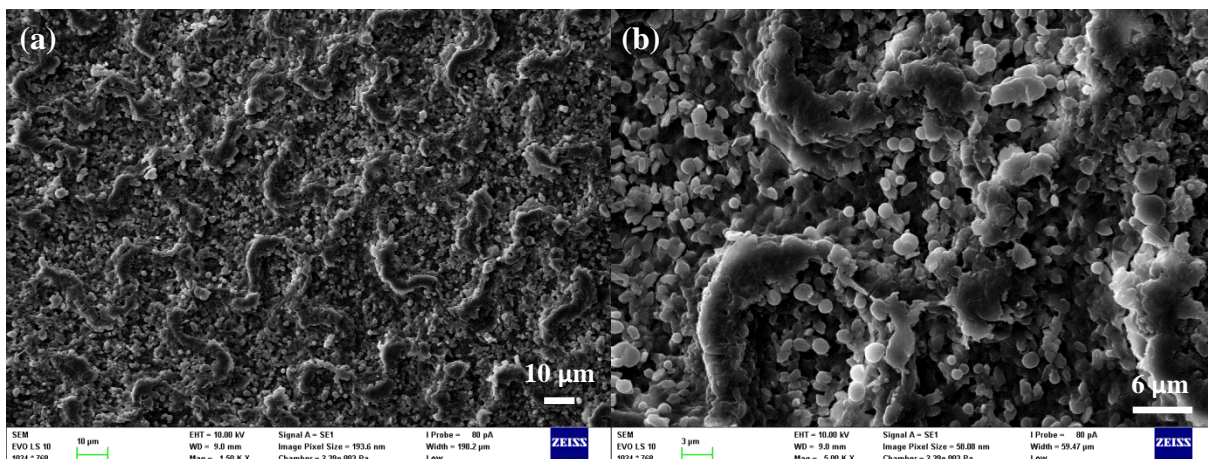
Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě enzymaticky izolovaných kutikul. Povrch kutikuly z vnější strany je hladký, dokonce zde nejsou pozorovatelná vyvýšená místa pletiv, jako tomu bylo v případě chemické metody izolace (Obr. 11a). Na povrchu jsou patrné pouze malé nečistoty, které zde utkvěly opět nedokonalým oplachem.

V případě adaxiální strany enzymaticky izolované kutikuly (Obr. 15a) nebyly pozorovány pro vnější stranu žádné výrazné struktury pletiv, celý povrch byl homogenní. Žádné výsledky nebyly dosaženy ani v případě 5 000násobného zvětšení (Obr. 15b), jak tomu bylo u chemicky izolovaných kutikul (Obr. 11a).



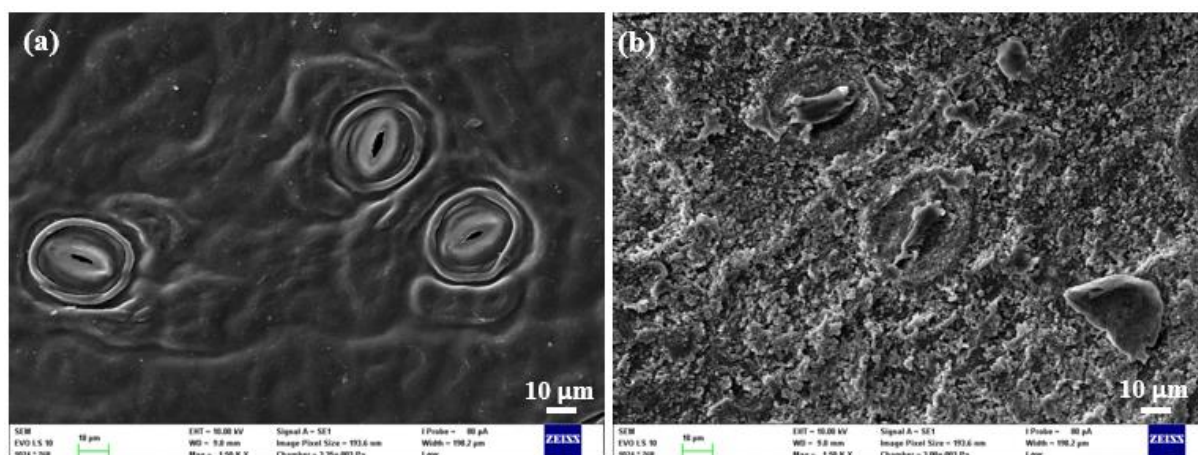
Obr. 15 Snímek adaxiální strany kutikuly izolované enzymatickou metodou. Povrch kutikuly z vnější strany (strana, kde není odstraňován mezofyl) (a), detailní snímek povrchu stejné kutikuly při 5 000násobném zvětšení (b).

Stejným způsobem byla analyzována i druhá strana kutikuly, ze strany odstranění mezofylu. Z dosažených snímků ze SEM je patrné, že struktura enzymaticky izolovaných kutikul je naprosto odlišná. Její struktura je tvořena z malých částic (Obr. 16b), struktura není tolik kompaktní, jako tomu bylo v případě chemicky izolovaných kutikul (Obr. 11). Z takto získaných poznatků usuzujeme na odlišné schopnosti izolačních metod a jejich vliv na strukturu a povrch kutikul. Na snímcích jsou patrné větší agregáty, které poukazují na neodstraněné zbytky mezofylu, které byly pozorovatelné i v případě chemicky izolovaných kutikul.



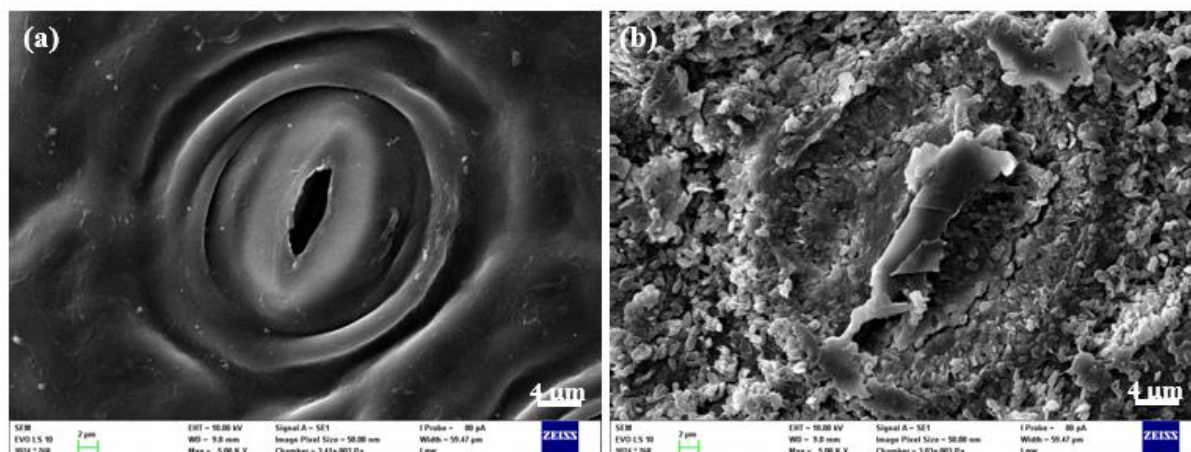
Obr. 16 Struktura adaxiální kutikuly izolované enzymatickou metodou. Celkový pohled na povrch kutikuly při 1 500násobném zvětšení (a), detailní snímek při 5 000násobném zvětšení (b).

Vezmeme-li v úvahu, že při samotné izolaci kutikul je mnohem jednodušší odstraňovat mezofyl při chemické izolaci než při enzymatické, bylo by logické si myslet, že kutikuly izolované chemickou metodou budou lépe očištěny. Avšak ze SEM snímků pro enzymaticky izolované kutikuly je patrné, že povrch kutikul je tvořen malými částicemi, připomínající zrníčka (Obr. 16b), kde může jít o lépe rozložené látky polymerů. V takovém případě by kutikula měla lepší penetrační vlastnosti, ovšem z výsledků obsažených v kapitole 6.1.5 je zřejmé, že enzymaticky izolované kutikuly mají naopak nižší penetrační schopnost než ty chemicky izolované. Proto ačkoli se povrch enzymaticky izolovaných kutikul může zdát čistší, ve skutečnosti enzymy nepronikají tak hluboko do struktury polymerů, čímž přispívají ke zvýšení tloušťky přírodní membrány. Tento fakt může hrát významnou roli v odlišnostech transportů látek skrze kutikuly, které byly realizovány v této práci.



Obr. 17 Snímky abaxiální strany enzymaticky izolované kutikuly. Vnější strana kutikuly (a), strana izolace mezofylu (b).

Na Obr. 17 jsou znázorněny snímky abaxiální strany kutikuly, kde obrázek (Obr. 17a) znázorňuje strukturu povrchu kutikuly ze strany vzduchu, tedy ze strany, kde nedochází k odstraňování mezofylu. Ta je čistá bez mechanických poškození s viditelnými stomaty. Naopak na snímku (Obr. 17b) je znázorněna kutikula ze strany odstraňování mezofylu, kde je zřejmé, že povrch je znečištěný zbytky nerozložených polymerních sloučenin. Pro detailní porovnání byly pořízeny snímky i při 5 000násobném zvětšení (Obr. 18), kde je možné porovnat povrchy kutikul mezi sebou.



Obr. 18 Snímky abaxiální kutikuly izolované enzymatickou metodou pořízené při 5 000násobném zvětšení. Abaxiální kutikula z vnější strany (a), abaxiální kutikula ze strany izolace mezofylu (b).

6.1.3 Mechanická profilometrie

Ze získaných výsledků z rastrovací elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že metoda izolace má významný vliv nejen na povrch kutikul, ale rovněž bude mít vliv i na jejich tloušťku. Navíc se předpokládá, že adaxiální kutikula musí odolávat většímu působení nežádoucích podmínek než abaxiální kutikula, čímž je logicky usuzováno, že by její tloušťka měla dosahovat vyšších hodnot.

Pro tento typ měření byl zvolen mechanický profilometr. Pro měření byly využity všechny typy kutikul, tedy chemicky a enzymaticky izolované a jejich adaxiální i abaxiální strany. Z následující tabulky (Tab. 6) bylo potvrzeno, že adaxiální kutikula je o 1–2 µm tlustší než abaxiální kutikula. Navíc byl potvrzen výsledek měření z rastrovací elektronové mikroskopie, a to ten, že chemicky izolované kutikuly mají opravdu menší tloušťku než enzymaticky izolované kutikuly, tudíž chemickou metodou izolace dochází k rozpouštění většího množství polymerních sloučenin, které se podílejí na tvorbě mezofylu. Stejně tak došlo k potvrzení faktu, že profil povrchu spodních kutikul

dosahuje vyšších hodnot než profil povrchu horních kutikul, což je logicky dáno přítomnými stomaty, které vytváří nehomogenní povrch kutikul.

Tab. 6 Hodnoty tloušťek a profilů rostlinných kutikul.

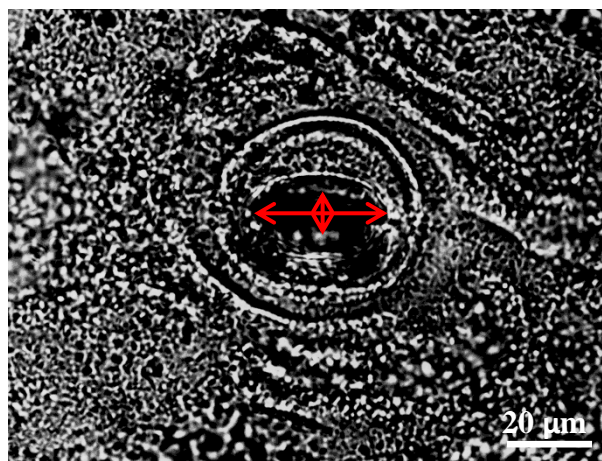
Typ izolace	typ kutikuly	průměrná tloušťka (μm)	průměrný profil (μm)
Chemická	adaxiální	5 ± 1	$1,0\pm 0,5$
	abaxiální	4 ± 1	$1,5\pm 0,8$
Enzymatická	adaxiální	9 ± 1	$0,7\pm 0,1$
	abaxiální	7 ± 2	$1,2\pm 0,3$

6.1.4 Stanovení velikosti stomat

Stomata rostlinných kutikul hrají významnou roli v penetraci látek z vnějšího prostředí do vnitřní struktury listu. Nejsou zodpovědná pouze za transport rozpuštěných látek v kapalně fázi, ale rovněž za transpiraci, a tedy výměnu plynů, regulaci vody atd.

Ze snímků z optického mikroskopu bylo možné provést vyhodnocení velikosti stomat, což bylo provedeno v programu Cellsens Entry. Stomata byla měřena ve dvou směrech, a to podélném a příčném (Obr. 19).

Výsledkem byly průměrné hodnoty příčných a podélných řezů stomat listu *Prunus laurocerasus*. Rozměry stomat pro chemicky izolované kutikuly v podélném směru odpovídaly hodnotě $14\pm 2 \mu\text{m}$ a výška stomat odpovídala $7\pm 2 \mu\text{m}$. Pro enzymaticky izolované kutikuly hodnoty odpovídaly pro příčný řez $12\pm 2 \mu\text{m}$ a výška stomat $5\pm 1 \mu\text{m}$. V rámci chyby směrodatné odchylky dosahovala stomata pro enzymaticky i chemicky izolované kutikuly stejných rozměrů.



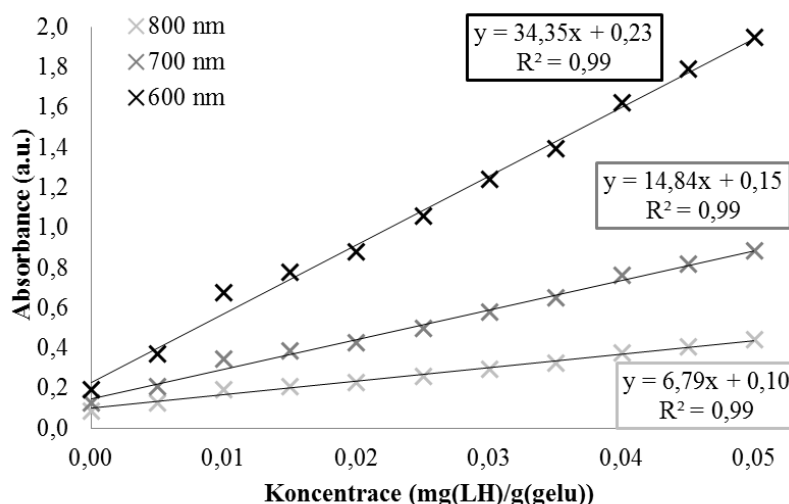
Obr. 19 Ukázka měření průduchu na abaxiální straně kutikuly.

6.1.5 Vyhodnocení difúzních experimentů pro teplotu 25 °C

Přijímací hydrogely byly v časových intervalech proměřeny na UV-VIS spektrometru, k čemuž bylo využito speciálního posuvného nástavce, který umožňuje vertikální posun kyvety, a tak změření spekter v různých pozicích kyvety. Spektra jsou tvořena kombinací dvou příspěvků, turbidita hydrogelu způsobující rozptyl světla na pevných částicích agarózy a absorpce světla na rozpuštěném lignohumátu nacházejícího se v kapalně fázi hydrogelu.

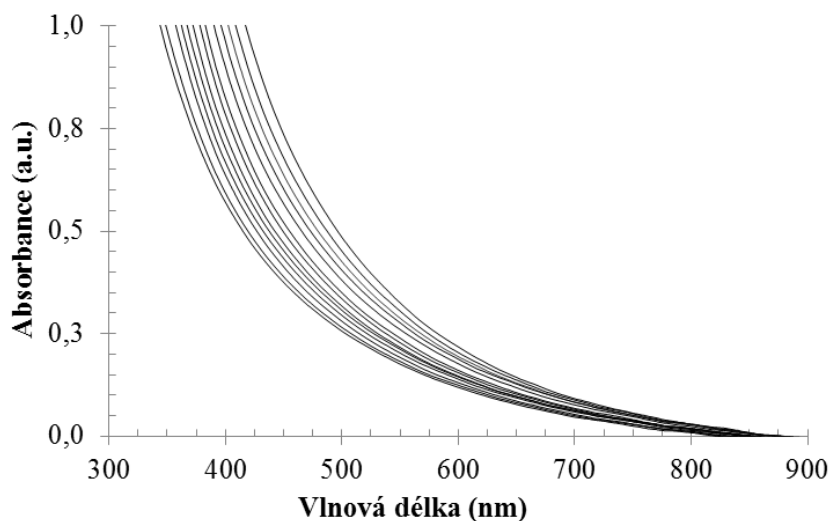
Pro stanovení koncentrace lignohumátu draselného v každém naměřeném UV-VIS spektru měřeného vzorku bylo nutné připravit koncentrační řadu agarózových hydrogelů. Ty obsahovaly

známé koncentrace Lignohumátu A (0–0,05 hm. % LH po kroku 0,005 hm. %) homogenně rozptýleného v hydrogelu. Křivka kalibrační přímky je uvedena v Obr. 20.



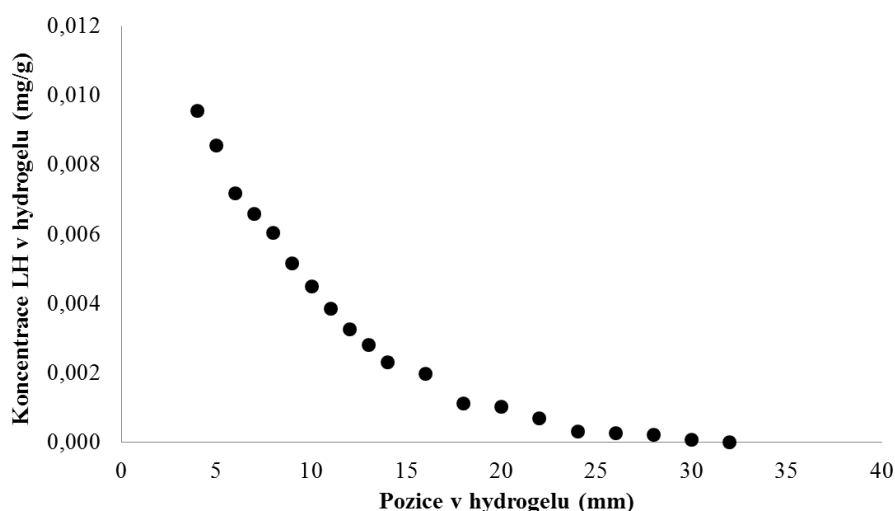
Obr. 20 Kalibrační křivka pro agarózové hydrogely a homogenně rozptýlený lignohumát draselný. Koncentrace LH v jednotlivých vzorcích kalibrační křivky (0; 0,005; 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030; 0,035; 0,040; 0,045; 0,050 hm. %).

Naměřená UV-VIS spektra LH nemají tvar klasického píku, ale jsou charakteristické absorpčním spektrem nacházejícího se v širokém rozmezí vlnových délek (Obr. 21), což je typická spektroskopická vlastnost pro huminové látky.



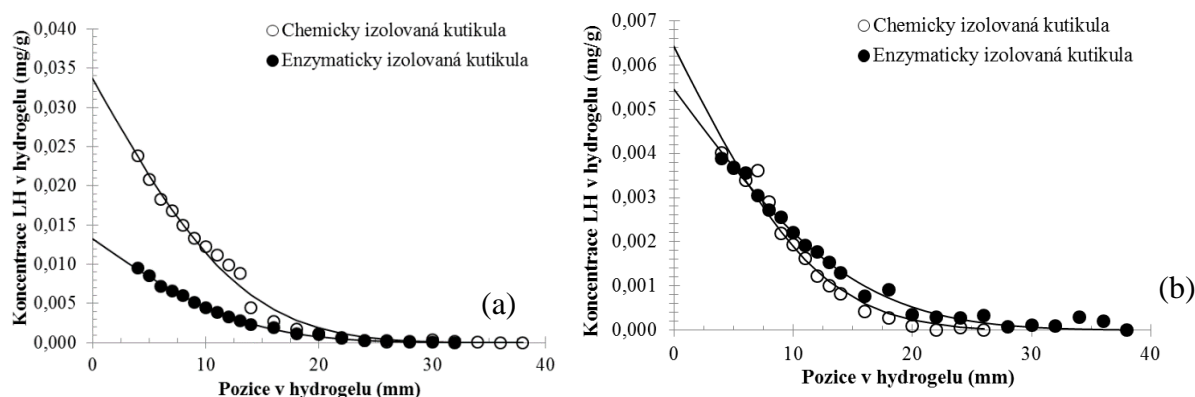
Obr. 21 Příklad UV-VIS spekter naměřených pro různé pozice přijímacího hydrogelu. Vzorek adaxiální chemicky izolované kutikuly po 96 hodinách.

Z naměřených UV-VIS spekter bylo možné sestavit tzv. koncentrační profily (Obr. 22), což jsou křivky určující závislost koncentrace lignohumátu draselného prošlého rostlinou kutikulou na vzdálenosti od rozhraní kutikula/hydrogel a v závislosti na čase experimentu. Koncentrace LH ve vzorcích byly stanoveny pomocí vícenásobného kalibračního přístupu, který se počítá z průměrů tří vlnových délek (600, 700 a 800 nm). Avšak s časem průběhu experimentu docházelo k vysokému zakoncentrovávání lignohumátu draselného na rozhraní květy (kutikula/hydrogel), kde tato koncentrace LH nebyla dále detekovatelná pomocí UV-VIS spektrometrie, kvůli vysoké absorbanci v prvních 5 mm květy.



Obr. 22 Koncentrační profil pro abaxiální enzymaticky izolovanou kutikulu. Doba penetrace LH 96 hodin.

Pro stanovení efektivního difúzního koeficientu a koncentrace na rozhraní květa/hydrogel bylo nutné zvolit vhodný matematický model, který celý experiment popisuje. Stanovené koncentrační profily z experimentálně naměřených dat bylo nutné proložit vhodnou teoretickou křivkou tzv. metodou iteračních čtverců (Obr. 23a, b), k čemuž byla využita funkce Řešitel z programu Microsoft Excel.



Obr. 23 Proložení experimentálních dat teoretickou křivkou. Abaxiální kutikula izolovaná enzymatickou metodou a chemickou metodou.

Aby experimentální data byla vhodně proložena a zároveň byly získány i difúzní parametry, byla pro popis měřených experimentů zvolena následující rovnice (2):

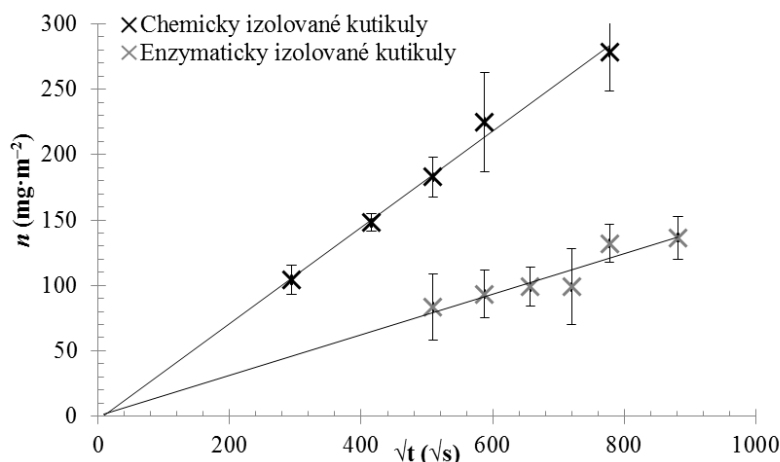
$$c = A \cdot \operatorname{erfc} \sqrt{\frac{x}{B}}, \quad (2)$$

kde c je koncentrace lignohumátu draselného v $\text{mg}_{\text{LH}}/\text{g}_{\text{gel}}$ a x je vzdálenost od rozhraní (kutikula/hydrogel) v mm, parametry A a B jsou fitovací konstanty a erfc je tzv. chybová funkce, je to neelementární funkce sigmoidního tvaru, která se obecně vyskytuje v nestacionárních difúzních rovnicích [49] **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** Při známých parametrech A a B v daném čase t lze celkový difúzní tok Lignohumátu A v jednotkové oblasti n (v $\text{mg}_{\text{LH}}/\text{m}^2$) snadno určit z integrace rovnice (2) v rozmezí $x = 0$ až $x = \infty$. Výsledkem je rovnice (2):

$$n(t) = \rho_{\text{gel}} \cdot \frac{A \cdot B}{\sqrt{\pi}} \quad (3)$$

kde ρ_{gel} je hustota gelu, která je vztažena na hustotu vody kvůli zjednodušení, protože používaný hydrogelový materiál je tvořen z 99 hm. % vody.

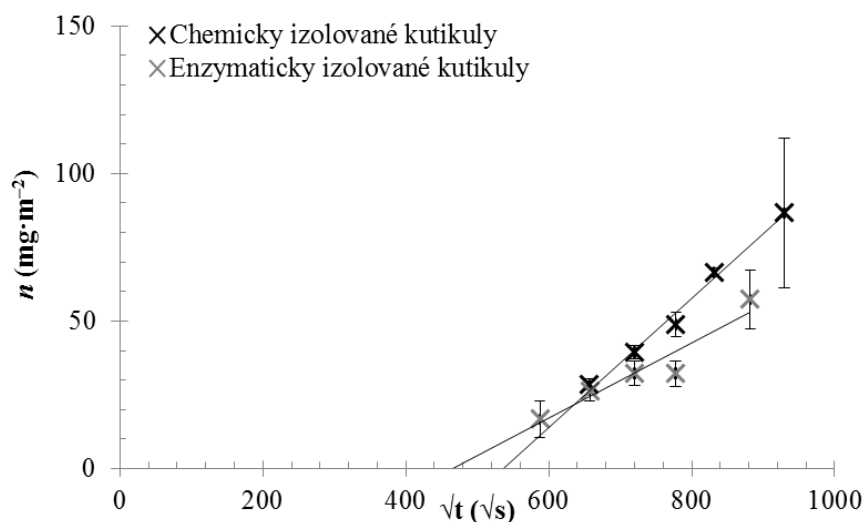
Pro nestacionární Fickovu difúzi rozpuštěné látky v kompozitním médiu se celkový difuzní tok n lineárně zvyšuje s druhou odmocninou času. Lineární závislost byla pozorována pro difúze Lignohumátu A skrze všechny studované rostlinné kutikuly (Obr. 24 a Obr. 25).



Obr. 24 Závislost totálního difúzního toku LH na odmocnině z času. Křivky zobrazené pro abaxiální kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou.

V případě abaxiálních kutikul byl zřejmý lineární průběh penetrace LH v závislosti na odmocnině z času t ($n = f(\sqrt{t})$) (Obr. 24) a průnik LH přes abaxiální rostlinnou kutikulu probíhá okamžitě bez ohledu na metodu izolace. Při odstraňování buněčných zbytků z rostlinné kutikuly dochází k odhalení stomat kutikuly a tím vznikají volně přístupná místa pro penetraci. Ačkoli jsou abaxiální kutikuly tvořeny především lipofilními sloučeninami, vznikem volných pórů dochází k usnadnění LH ze zdrojového hydrogelu do přijímacího hydrogelu, čímž se tato membrána stává lépe propustnou pro aplikované LH sloučeniny.

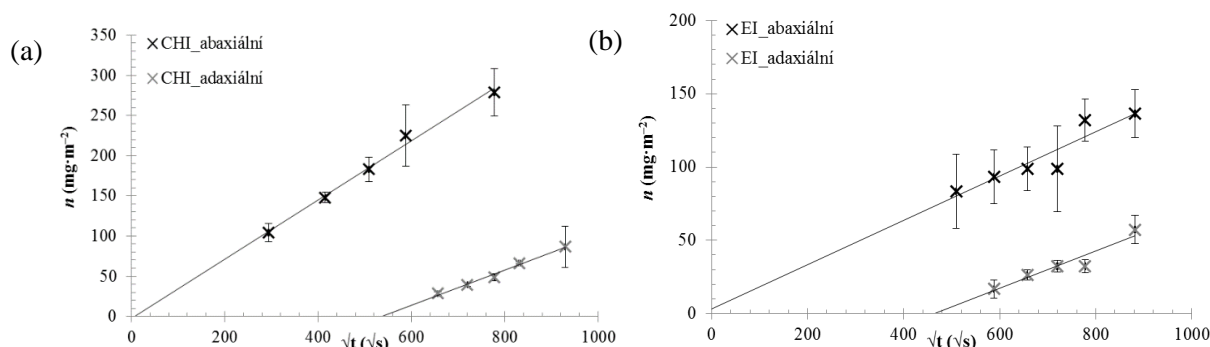
V případě adaxiálních kutikul byl rovněž zřejmý lineární průběh penetrace LH v závislosti na odmocnině z času ($n = f(\sqrt{t})$) (Obr. 25), avšak u těchto horních kutikul došlo k posunu celkových toků penetrace k delším časům. Čas potřebný pro průnik LH skrze adaxiální kutikuly je nazýván jako tzv. zpožděný čas. To potvrzuje, že v případě adaxiálních kutikul dochází k molekulárnímu transportu skrze kompaktní bariéru na rozdíl od abaxiálních kutikul, kde primárně dochází k transportu skrze průduchy.



Obr. 25 Závislost totálního difúzního toku LH na odmocnině z času. Křivky zobrazené pro adaxiální kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou.

Zatímco penetrace lignohumátu draselného skrze adaxiální kutikuly izolované chemickou metodou probíhala po 60 hodinách, u chemicky izolovaných adaxiálních kutikul došlo ke zpoždění transportu LH, penetrace proběhla až po 80 hodinách. Tyto rozdíly v penetracích jsou způsobené strukturálními rozdíly kutikul izolovaných odlišnými metodami. Například metodou mechanické profilometrie bylo zjištěno, že chemicky izolované kutikuly jsou tenčí než kutikuly izolované enzymatickou metodou. Tyto výsledky korespondovaly se snímky pořízenými na rastrovacím elektronovém mikroskopu. Z výše uvedených fotografií je patrná strukturální odlišnost kutikul, dále jsou zde zachyceny neodstraněné zbytky mezofylu, který tloušťku kutikul ovlivňuje.

Zobrazení rozdílů totálních difúzních toků pro adaxiální a abaxiální kutikuly izolované chemicky a enzymaticky jsou uvedeny na Obr. 26. Z grafů je zřejmé, že v obou případech došlo k rychlejší penetraci LH skrze abaxiální kutikuly, a naopak pomalejší byl transport lignohumátu draselného skrz adaxiální kutikuly. V případě chemicky izolovaných kutikul je totální difúzní tok 3,2krát vyšší pro penetraci LH skrze abaxiální kutikuly v porovnání s adaxiálními. V případě enzymaticky izolovaných kutikul byl totální difúzní tok pro abaxiální kutikuly navýšen 2,4krát.

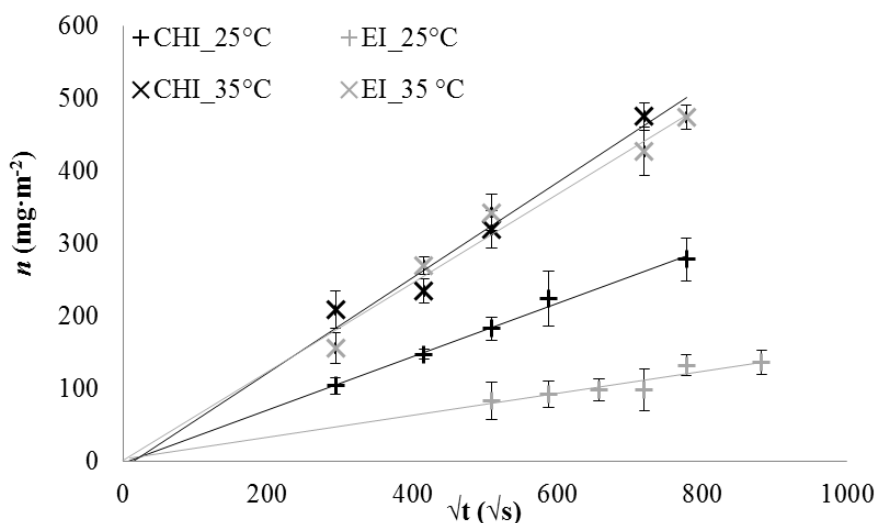


Obr. 26 Porovnání křivek totálních toků pro adaxiální a abaxiální kutikuly izolované chemickou metodou (a) a enzymatickou metodu (b).

6.1.6 Porovnání a souhrn výsledků difúzní experimentů přes rostlinné kutikuly pro teploty 25, 35 a 45 °C

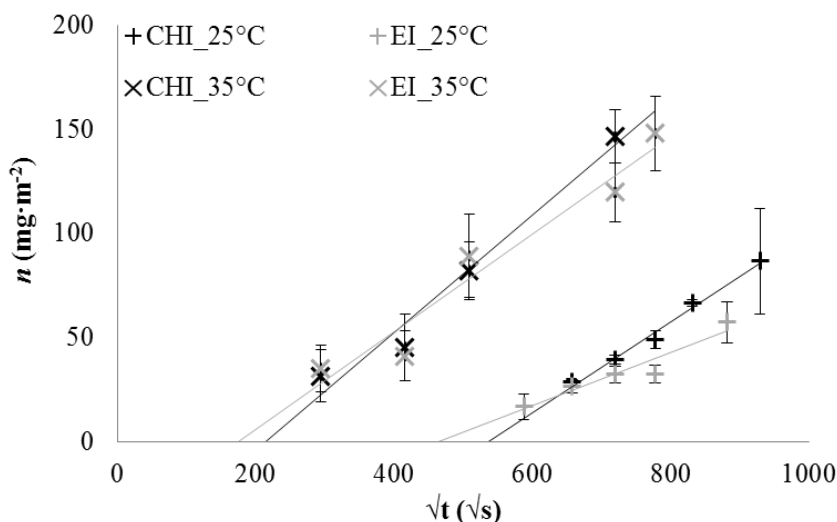
V této kapitole budou shrnuty a porovnány dosavadní difúzní experimenty. Důležitým předpokladem bylo, že s rostoucí teplotou budou rychleji probíhat transportní experimenty, což se potvrdilo srovnáním výsledků experimentů probíhajících pro teplotu 25 a 35 °C (Obr. 27). Při zvýšení teploty

prostředí došlo k navýšení hodnoty totálního difúzního toku LH 1,7krát pro chemicky izolované kutikuly a 3,5krát pro enzymaticky izolované kutikuly.



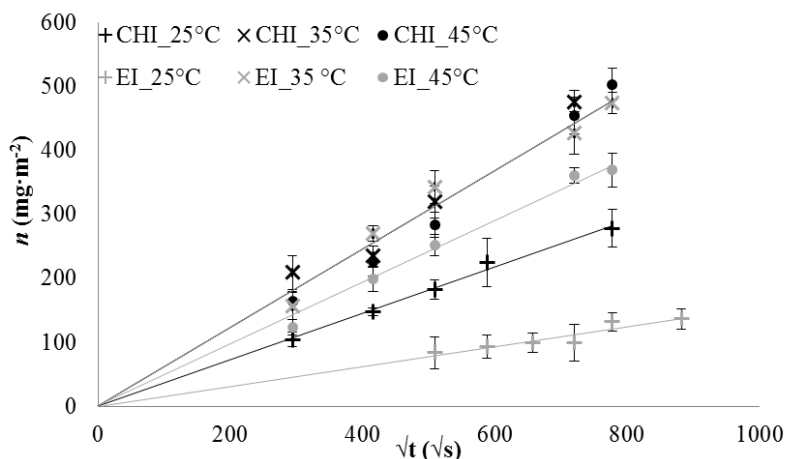
Obr. 27 Porovnání difúzních experimentů LH skrze abaxiální rostlinné kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou pro teploty 25 a 35 °C.

V grafu (Obr. 28) jsou porovnány výsledky experimentů adaxiálních kutikul realizovaných pro teploty 25 a 35 °C. Z uvedených křivek je patrné, že s rostoucí teplotou dochází k navýšení hodnot totálních difúzních toků LH penetrujících skrze rostlinné kutikuly. Bylo vypočteno, že u adaxiálních kutikul izolovaných chemickou metodou došlo k navýšení totálního difúzního toku 2,6krát a u enzymaticky izolovaných kutikul došlo o navýšení 1,7krát.



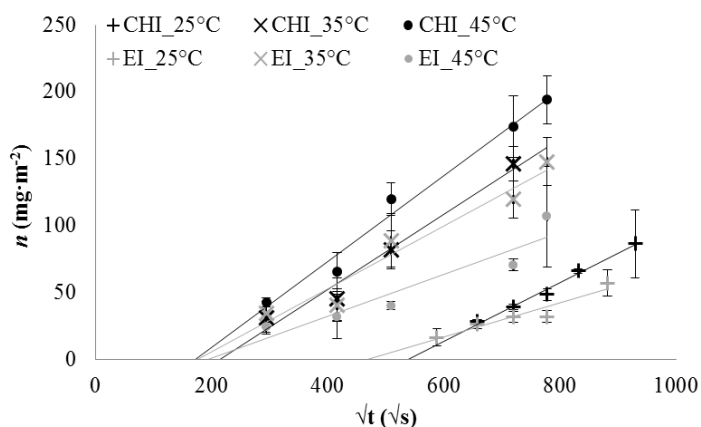
Obr. 28 Porovnání difúzních experimentů LH skrze adaxiální rostlinné kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou pro teploty 25 a 35 °C.

V uvedeném grafu (Obr. 29) jsou zobrazeny křivky abaxiálních rostlinných kutikul izolovaných chemickou a enzymatickou metodou. Zajímavým zjištěním bylo, že experimenty probíhající při 45 °C nedosahovaly vyšších hodnot totálních difúzních toků než experimenty realizované pro teplotu 35 °C, jak bylo očekáváno. Tyto výsledky jsou vysvětleny tím, že ačkoli vzorky difúzních párů byly uloženy do exikátoru s vodou, aby nedocházelo k vysušování agarózových hydrogelů, respektive rostlinné kutikuly. Nakonec se však ukázalo, že tato ochrana proti vysychání byla nedostatečná, neboť během experimentu již nedocházelo ke styku zdrojového a přijímacího hydrogelu, což vysvětluje nižší hodnoty totálních difúzních toků než pro experimenty realizované pro 35 °C.



Obr. 29 Souhrn difúzních experimentů pro jednotlivé teploty 25, 35 a 45 °C. Závislost difúzního toku na odmocnině z času pro abaxiální chemicky a enzymaticky izolované kutikuly.

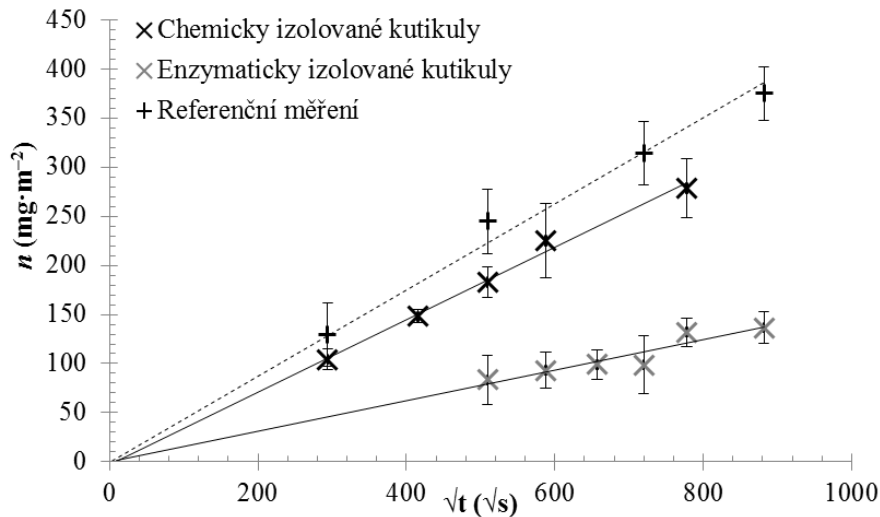
Výsledky adaxiálních kutikul izolovaných chemickou a enzymatickou metodou jsou uvedeny v grafu (Obr. 30). V případě experimentů realizovaných za podmínek 45 °C bylo docíleno navýšení totálního difúzního toku pro chemicky izolované kutikuly, ovšem enzymaticky izolované kutikuly dosahovaly nižších hodnot než experimenty provedené při teplotě 35 °C. Navíc je z grafu zřejmé, že difúze experimentů při teplotách 35 a 45 °C byla započata v podobném čase, který odpovídal 13,5 hodině.



Obr. 30 Souhrn difúzních experimentů pro jednotlivé teploty 25, 35 a 45 °C. Závislost difúzního toku na odmocnině z času pro adaxiální chemicky a enzymaticky izolované kutikuly.

6.1.7 Srovnávací difúzní experimenty (gel-gel difúzní pár)

Pro srovnání výše uvedených difúzních experimentů přes rostlinné kutikuly byly realizovány srovnávací experimenty, které byly založeny na přípravě difúzních párů pouze z přijímacích a zdrojových hydrogelů. Přijímací hydrogely byly po dobu 10 dní měřeny na UV-VIS spektrometru a z naměřených dat byl sestaven graf závislosti totálního difúzního toku na odmocnině z času (Obr. 31).



Obr. 31 Průběh celkového difúzního toku LH v závislosti na odmocnině z času pro teplotu 25 °C. Porovnání reálných vzorků přes abaxiální strany chemicky a enzymaticky izolovaných kutikul s referenčními vzorky.

Z grafu je patrné, že difúze lignohumátu draselného v referenčních a reálných vzorcích probíhá stejně, tedy jedná se o lineárně rostoucí průběh. Avšak v referenčních vzorcích LH difunduje rychleji, což je logicky dané tím, že tyto vzorky neobsahují membránu, která by difúzi LH zpomalovala.

Srovnávací experimenty nebyly realizovány pro teploty 35 a 45 °C, neboť difúze probíhala příliš rychle již po prvním dnu měření, kdy koncentrace na rozhraní byla natolik vysoká, že ji nebylo možné změřit. Navíc s dalšími dny docházelo k rychlému vysychání hydrogelových matric, ačkoli byly dány do exikátoru s vodou, což vedlo ke zkreslení výsledků měření.

7 ZÁVĚR – EXPERIMENTÁLNÍ A VÝSLEDKOVÉ ČÁSTI I

Předložená disertační práce byla zaměřena na studium transportu kapalných lignohumátů skrze rostlinné kutikuly izolované z listů *Prunus laurocerasus*. Hlavním cílem disertační práce bylo optimalizovat a připravit vhodný matematický model pro výpočet a stanovení fundamentální parametrů difúzních experimentů pro systém gel-gel difúze a volné difúze, které by v budoucnu mohly sloužit jako jednoduché techniky pro stanovení prošlého množství zkoumaných látek skrze rostlinné kutikuly. První kapitoly experimentální a výsledkové části jsou zaměřeny na charakterizaci použitých materiálů, tedy rostlinných kutikul a hydrogelových nosičů, které byly použity pro stěžejní část difúzních experimentů.

Z optické a rastrovací mikroskopie byl potvrzen rozdíl ve struktuře abaxiální a adaxiální strany kutikul a rovněž u kutikul izolovaných odlišnými metodami (chemicky vs enzymaticky). Na základě těchto technik bylo možné zjistit, že abaxiální kutikuly obsahují stomata (průduchy) a adaxiální jsou tvořeny jednoduchou pletivovou sítí. Rastrovací elektronová mikroskopie navíc odhalila, že chemicky izolované kutikuly byly lépe zbaveny polysacharidových zbytků, respektive chemický roztok prostupoval do hlubších částí kutikuly ve srovnání s enzymaticky izolovanými kutikulami.

Tento fakt byl potvrzen měřením na mechanickém profilometru, díky němuž byla stanovena tloušťka jednotlivých kutikul. Z Tab. 6 je zřejmé, že tloušťka chemicky izolovaných kutikul odpovídá 5 ± 1 μm , naopak tloušťky enzymaticky izolované kutikuly se pohybují kolem 8 ± 1 μm . Tento rozdíl tlouštěk je dán nerozpuštěnými zbytky (polysacharidy) v případě kutikul získaných enzymatickou izolací, chemická metoda je o poznání drastičtější, a tudíž dochází k rozpuštění těchto látek a tím pádem se dostáváme do hlubších vrstev kutikuly. Z uvedené tabulky je rovněž patrné, že abaxiální kutikuly jsou zpravidla o 1–2 μm silnější, což je dáno přítomností stomat.

Optickou mikroskopií byla rovněž provedena měření průměrů stomat u chemicky a enzymaticky izolovaných kutikul. Na základě dosažených výsledků bylo zjištěno, že metoda izolace nemá vliv na rozšíření, respektive průměr stomat. Difúzní experimenty tedy budou ovlivněny z hlediska rozdílné povahy abaxiálních a adaxiálních kutikul (kutikuly s průduchy ve srovnání s kutikulami bez průduchů) a z hlediska odlišných tlouštěk kutikul, což je dáno metodou izolace.

Charakterizace hydrogelových nosných systémů byla rovněž provedena v rámci dostupné techniky FCH VUT v Brně. Z dosažených výsledků bylo prokázáno, že hydrogelové matrice s a bez obsahu lignohumátu draselného neovlivňují procesy difúze, protože jejich inertnost zůstává bez ohledu na přídavek LH stejná. Zároveň bylo zjištěno, že řádově mají oba hydrogely stejnou velikost pórů, tedy i díky tomuto faktu nebude docházet k ovlivnění difúzních procesů rozdílnou pórovitostí.

Difúzní experimenty byly realizovány s využitím výše uvedených materiálů a probíhaly následujícími difúzními metodami – nestacionární difúze z roztoku (koncentrovaný roztok lignohumátu, jehož koncentrace se v průběhu experimentu nemění) a nestacionární difúze ze zdrojového hydrogelu (dva totožné hydrogely lišící se jen přítomností lignohumátu). Pro rychlé kvalitativní zhodnocení funkce difúzních metod byla proveden jednoduchý test vizuální kontroly, kde bylo možné sledovat průchod LH skrze abaxiální a adaxiální kutikulu. Z tohoto jednoduchého experimentu bylo zjevné, že abaxiální kutikuly umožňují transport LH z hlediska kinetiky mnohem rychleji než adaxiální kutikuly, kde barevné zabarvení přijímacího hydrogelu bylo téměř zanedbatelné. Podobný jev byl pozorován i v případě chemicky izolovaných kutikul, avšak pro plnohodnotné posouzení a kvantifikaci procesu bylo provedeno měření na UV-VIS spektrometrii.

Ze získaných výsledků bylo potvrzeno, že přes abaxiální kutikuly dochází k rychlejšímu transportu látek než přes adaxiální kutikuly, což je zapříčiněno přítomností stomat. Ty byly rovněž detekovány výše uvedenými mikroskopickými technikami. Dále bylo zjištěno, že rychlost transportu lignohumátu probíhá odlišně v případě stejného typu kutikuly (u abaxiální, tak i adaxiální), avšak s ohledem na typ izolace, kterou byly jednotlivé kutikuly získány. Z dosažených výsledků uvedených na Obr. 29 a Obr. 30 je zřejmé, že chemicky izolované kutikuly umožňují rychlejší transport lignohumátu než

kutikuly enzymatické, což je zapříčiněno také tloušťkou rostlinných kutikul. Z mechanické profilometrie bylo stanoveno, že enzymaticky izolované kutikuly dosahují větších tloušťek kvůli nerozpuštěné vrstvě polysacharidů, což je v korelaci s naměřenými daty.

Ze závěru kapitoly vyplývá, že se podařilo připravit vhodný difúzní model, jednoduché stanovení modelových látek používaných v zemědělství procházejících skrze rostlinou kutikulu. Zároveň tyto jednoduché difúzní techniky mohou sloužit i jako vhodný nástroj pro detekci průchodu do listů rostlin aktivních látek používaných v zemědělství metodou foliárního hnojení. Rovněž se podařilo sestavit vhodný matematický model pro výpočet těchto transportních procesů, které by mohly být využívány odbornými institucemi a průmyslovým odvětvím v případě studia penetrace látek přes listy a stanovení vhodné indikační koncentrace pro výživu rostlin. Tato metoda by mohla být do budoucna optimalizovaná pro stanovení bezbarvých látek, avšak to by bylo předmětem dalšího výzkumu.

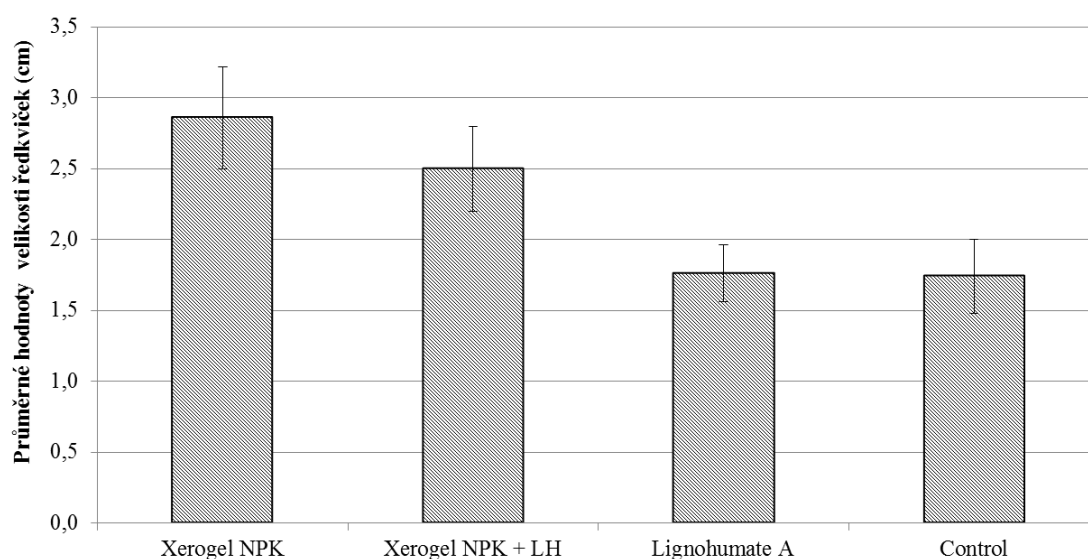
8 VÝSLEDKY A DISKUZE – EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST II

8.1 Sklizeň a charakterizace rostlin

Sklizeň rostlin probíhala po 9 týdnech od jejich zasetí. Rostliny bylo nutné opatrně vyjmout z půdy a to tak, aby nedošlo k poškození kořenového systému, zejména u rostlin hlávkového salátu setého a špenátu setého. Po vyjmutí byly rostliny řádně opláchnuty, osušeny, změřeny, zváženy a fotograficky zaznamenány. Z dosažených výsledků bylo stanoveno, které z aplikovaných přípravků vedly k nejlepším výsledkům z hlediska velikosti a kvality.

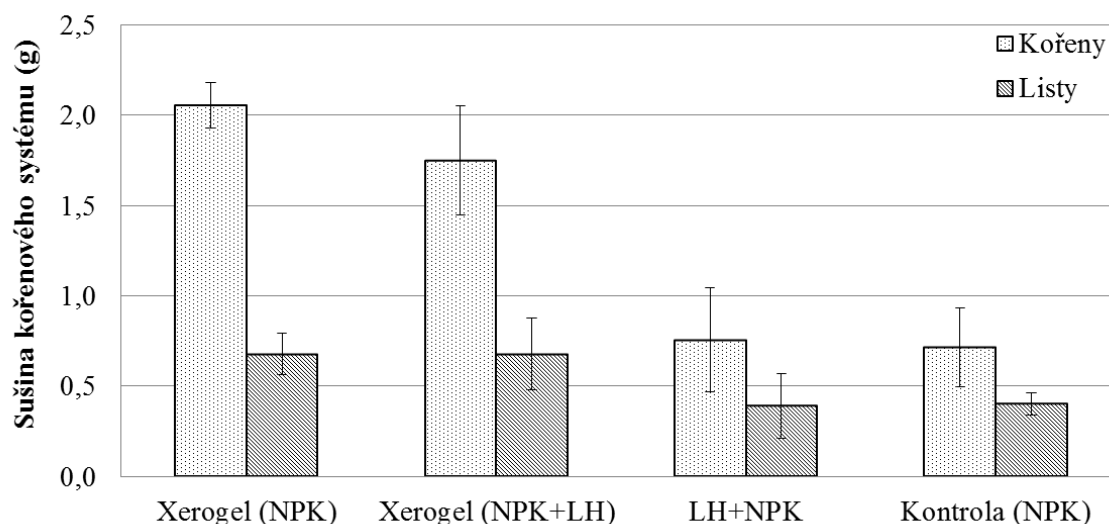
8.1.1 Ředkvička setá

Z dosažených výsledků je zřejmé, že ředkvičky ošetřené hydrogelovými materiály dosahovaly větších průměrů plodů než ředkvičky ošetřené LH s NPK nebo pouze NPK. Přípravky xerogel (NPK) respektive xerogel (LH+NPK) dosahovaly velmi podobných hodnot průměrů velikostí ředkviček, kdy v rámci statistické chyby jsou tyto výsledky totožné. Shodnost výsledků je zřejmá pro plody ošetřené LH s NPK a pouze NPK, neboť mezi dosaženými výsledky není významný rozdíl.



Obr. 32 Průměrné hodnoty velikostí průměrů ředkviček v závislosti na použitých přípravcích.

Plody ředkvičky seté byly po změření a zvážení vysušeny v sušárně při teplotě 50 °C po dobu 1 týdne. Vysušené vzorky byly opět zváženy a ze získaných dat byl sestaven graf závislosti sušiny ředkvičky seté v závislosti na použitém přípravku. Z grafu (Obr. 33) je patrné, že rostliny ošetřené xerogelem dosahovaly vyšších hodnot hmotnosti sušiny listů než vzorky ošetřené LH s NPK nebo ošetřené pouze NPK.



Obr. 33 Přehled sušiny kořenů a listů ředkvičky seté v závislosti na aplikovaném přípravku.

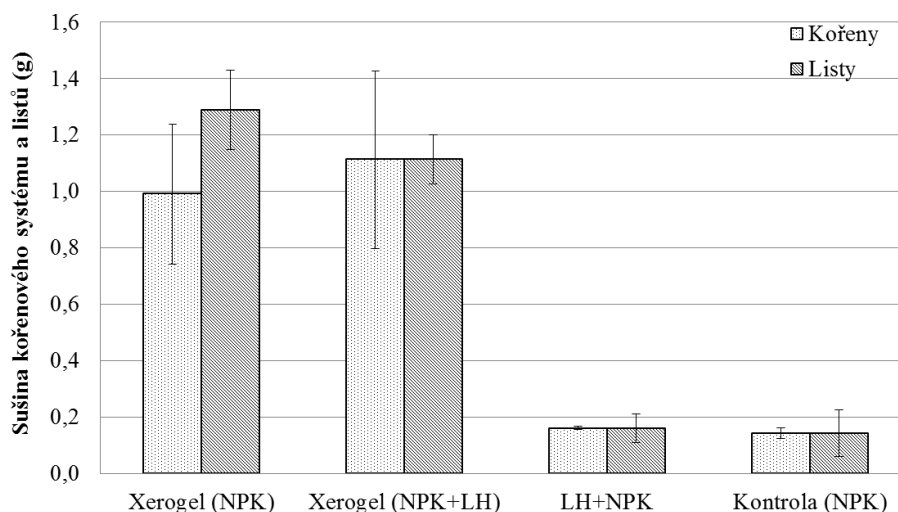
Na začátku experimentů bylo předpokládáno, že humatizovaný xerogel bude mít lepší vliv na růst a výnosnost plodit než xerogel s obsahem pouze NPK. Na základě dosažených výsledků je ale zřejmé, že lignohumát draselný v xerogelu nemá žádný významný vliv na růst plodů, listů nebo kořenů ředkvičky seté. To, že lignohumát draselný neměl významný vliv na výnosnost plodiny, mohlo být způsobeno tím, že LH bylo v xerogelu zastoupeno v nízké koncentraci a k jeho uvolňování docházelo příliš pomalu, čímž jeho účinky nemohly výrazně ovlivnit růst ředkvičky seté.

V práci [36] bylo studováno uvolňování LH z xerogelu jednoduchými luhovacími experimenty a bylo zjištěno, že xerogel (LH + NPK) uvolnil po 9 týdnech 16 mg LH na 1 l vody. Na základě těchto experimentů, které probíhaly v izolovaném prostředí při 100% vlhkosti, je patrné, že při přípravě superabsorbentů byla použita nízká koncentrace lignohumátu draselného. Je tedy zřejmé, že taková nízká koncentrace LH nemůže mít významný pozitivní vliv na růst rostlin.

Obdobných výsledků bylo dosaženo rovněž při srovnání výtěžků sušin listů a kořenů pro LH s NPK a pro kontrolní půdu obsahující pouze NPK. Rovněž bylo předpokládáno, že LH povede ke zvýšení výnosů rostlin, ale vzhledem ke koncentracím použitým v xerogelech bylo nezbytné, aby stejná koncentrace byla využita i do těchto vzorků. Bohužel se ukázalo, že tato koncentrace byla nedostatečná, neboť byla použita pouze na začátku experimentu a nikoli i v jeho průběhu. To mělo za následek, že vzorky obsahující LH s NPK dosahovaly podobných výsledků jako kontrolní vzorky.

8.1.2 Špenát setý

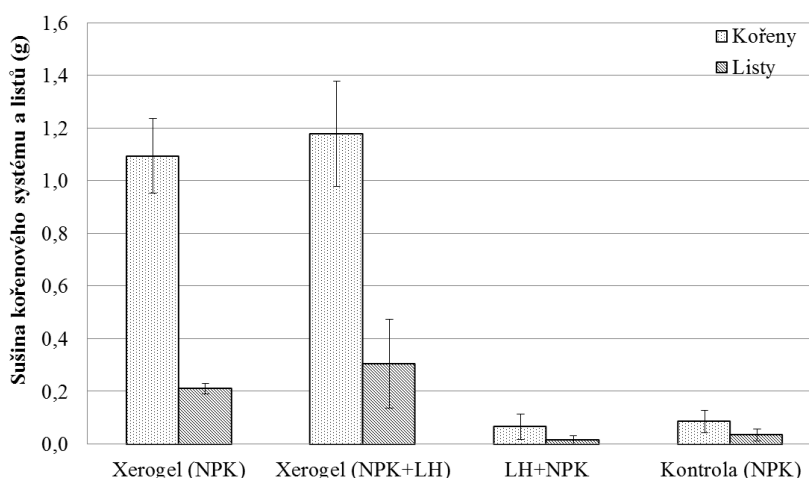
Další studovanou rostlinou byl špenát setý. Data získaná z vážení kořenového systému a listů špenátu setého byly vyneseny do grafu (Obr. 34), ze kterého jsou jasně vidět rozdíly mezi rostlinami ošetřenými hydrogelovými materiály a ostatními přípravky. I v případě špenátu nejsou viditelné výrazné rozdíly mezi xerogelovými přípravky s obsahem LH bez jejich přídatku. Opět platí tvrzení, že pro přípravu xerogelů byla použita nízká koncentrace LH, neboť ani v případě špenátu setého nedošlo ke zvýšení výnosu studovaných rostlin.



Obr. 34 Přehled sušiny kořenů a listů špenátu setého v závislosti na aplikovaném přípravku.

8.1.3 Hlávkový salát

Výsledky získané ze sušiny kořenového systému a listů v závislosti na použitém přípravku jsou uvedeny v grafu (Obr. 35). Z něj je patrné, že oba druhy použitých xerogelů měly významný vliv na výnos rostlin, bohužel to se nedá tvrdit o přípravcích LH s NPK, respektive pouze NPK. Je zřejmé, že tyto přípravky v použitých množstvích neměly významný vliv na výnos rostlin.



Obr. 35 Přehled sušiny kořenů a listů hlávkového salátu setého v závislosti na aplikovaném přípravku.

8.2 Analýza půdy po sklizni rostlin

Po sklizni a charakterizaci rostlin byla provedena analýza půdy. Pro vzorky půd bylo stanoveno pH a elektrická vodivost, dále množství vázaného dusíku v půdě. Dusík je buď vázán na dusičnanové anionty jako $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$ nebo amoniové kationtů v podobě $[\text{NH}_4^+]\text{-N}$. V poslední řadě bylo stanoveno množství fosforu v půdě tzv. Colwell P testem.

8.2.1 Stanovení pH ve vzorcích půdy

Vlastnosti a charakter půdy závisí od hodnot pH. Půdy o pH 4,4 jsou extrémně kyselé, půdy o pH v rozmezí 4,6–5,0 jsou kyselé a v rozmezích 5,1–5,5 jsou tzv. slabě kyselé. Půdy v rozmezí pH 6,5–7,2 jsou neutrální, mezi 7,3–7,7 jsou tzv. alkalické a nad hodnotu 7,7 silně alkalické [37].

Hodnoty pH mají důležitou roli v pěstování rostlin, neboť jsou-li půdy příliš alkalické, potom v takových podmínkách nevezdou rostliny, které preferují kyslejší podmínky (Azalka, Rododendron, Foterčila) a naopak. V neutrálních až mírně alkalických (pH = 8) půdách jsou zejména přítomny kationty Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ a anionty Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , HPO_4^{2-} , HCO_3^- a H_3BO_3 . V kyselých (pH = 4,4) půdách se zejména vyskytují kationty K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} a Al^{2+} ve formě ligandu, z řad aniontů jsou zde zejména zastoupeny SO_4^{2-} , Cl^- , F^- a H_2CO_3 [38]. Neutrální půdy jsou díky svému pH příznivé pro tvorbu biologické aktivity půdy [37].

V grafu (Obr. 36) jsou uvedeny hodnoty pH vzorků půd po sklizni rostlin. Kontrolní vzorky půd a půdy ošetřené LH s NPK nabývaly průměrných hodnot pH 5,4, tedy se jednalo o mírně kyselé typy půd. Vliv na změnu pH neměl ani přípravek lignohumátu draselného, neboť jak je patrné z grafu, v rámci statistické chyby dosahovaly kontrolní půdy a půdy s obsahem LH stejných hodnot pH. Naopak půdy ošetřené hydrogelovými materiály nabývaly průměrných hodnot pH mezi 6,3–6,4, tedy došlo ke zvýšení pH o 1. Z toho plyne, že vlivem aplikace xerogelů došlo k neutralizaci půd, jak již bylo uvedeno výše, neutrální půdy mají blahodárný vliv na tvorbu bakterií a mikroorganismů, které jsou tolik prospěšné pro funkci půdy a pozitivně ovlivňují i samotný růst rostlin.

Jak bylo uvedeno v publikaci [38], neutrální půdy jsou bohaté na prvky N, P a K, kdežto kyselé půdy tyto prvky postrádají, zejména pak minerály N a P. Přitom právě N, P, K má významný vliv na vývoj a růst rostlin. Na základě těchto výsledků je zřejmé, že plodiny ředkvičky, špenátu a hlávkového salátu preferují neutrální půdní prostředí nad kyselým, neboť ty vzorky ošetřené xerogely dosahovaly vyšších výnosů.



Obr. 36 Průměrné hodnoty pH půd v závislosti na aplikovaném přípravku. Vzorky půd po sklizni rostlin.

8.2.2 Stanovení elektrické vodivosti ve vzorcích půdy

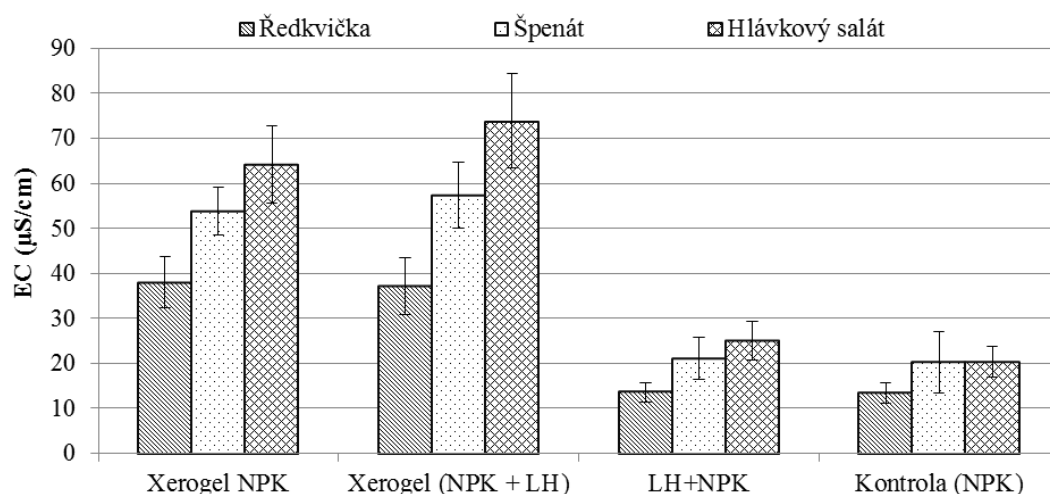
Dalším studovaným parametrem odebraných vzorků půd byla elektrická vodivost. Její hodnota určuje tzv. salinitu půdy, tedy míru zasolení půdy. To může být způsobeno přirozeně nebo činností člověka. Salinita negativně ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti půdy a negativně ovlivňuje příjem vody do rostlin. Sůl představuje tzv. hypertonické prostředí, které způsobuje odčerpávání vláhy z rostlin. Zasolené půdy jsou často označovány jako půdy dehydratované, jsou to půdy s hodnotou elektrické vodivosti vyšší než 4 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ [39].

Z toho plyne, čím vyšší bude hodnota koncentrace solí obsažených v půdách, tím více bude docházet k negativním dopadům na biomasu a rostliny, zejména z hlediska jejich kondice a výnosu. V zasolených půdách totiž dochází k omezení příjmu vody, což zapříčiňuje dehydrataci rostlin, a tudíž i příjem živin.

Dosahují-li hodnoty elektrické vodivosti v půdě 0–2 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, potom rostliny plně prospívají bez jakýchkoliv problémů, hovoříme o ideálním stavu půdy. Je-li vodivost v rozmezí 2 000–4 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, potom jsou rostliny citlivější a přestávají být plně prospívající. Půdy s elektrickou vodivostí v rozmezí 4 000–8 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ způsobují neprospívání většiny rostlin, přežijí jen některé druhy. Má-li vodivost 8 000–16 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, potom je schopna přežít pouze určitá úzká skupina rostlin a při hodnotách vyšších nad 16 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ již žádné rostliny nejsou schopny růstu [39].

V grafu (Obr. 37) jsou vyneseny hodnoty elektrické vodivosti vzorků půd v závislosti na použitém přípravku. Z uvedených výsledků je zřejmé, že žádný z použitých přípravků nezvyšuje salinitu půdy natolik, aby došlo k negativním dopadům na kvalitu a kvantitu rostlin. Hodnoty elektrických vodivostí aplikovaných přípravků se pohybovaly v rozmezí 13–74 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Dosažené hodnoty vodivosti se pohybují v rozmezí, které je pro rostliny prospěšné, a které podporuje jejich růst a kvalitu.

Vyšších hodnot elektrických vodivostí bylo dosaženo pro hydrogelové přípravky a z průběhu trendu sloupcového grafu je patrné, že xerogely s přidavkem LH zvyšovaly hodnoty vodivosti, avšak v rámci statistické chyby se oba typy xerogelů chovaly stejně. Naopak nižších hodnot vodivosti bylo dosaženo u vzorků půd ošetřených LH s NPK a pro kontrolní půdy. Také zde je z trendu sloupcového grafu patrné, že lignohumát draselný způsoboval nepatrné zvýšení elektrické vodivosti, ačkoli v rámci chyby můžeme tvrdit, že je toto zvýšení velmi zanedbatelné.



Obr. 37 Grafická závislost elektrické vodivosti vzorků půd na aplikovaném přípravku. Vzorky půdy po sklizni rostlin.

Zvýšení elektrické vodivosti vzorků půd ošetřených xerogely je zapříčiněn draselnými ionty ze sloučenin hydroxidu draselného a peroxodisulfátu draselného, které se používají při přípravě superabsorbentů.

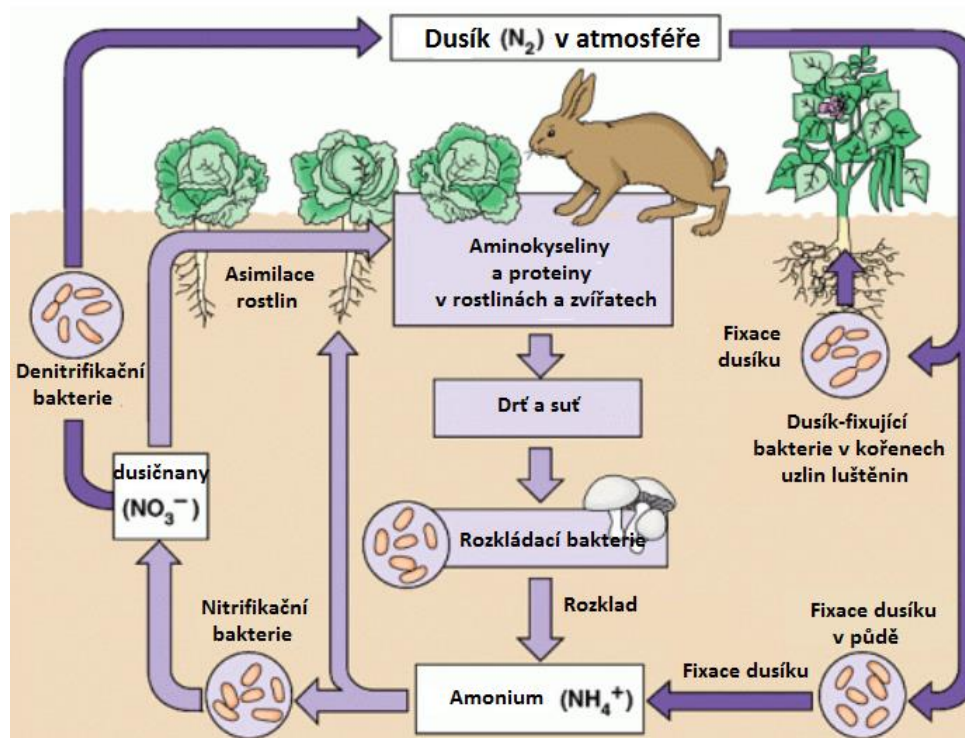
8.2.3 Stanovení dusíku v půdě ve formě $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$ a $[\text{NH}_4^+]\text{-N}$

V následujícím kroku bylo stanoveno množství dusíku v půdě vázaného v podobě $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$ a $[\text{NH}_4^+]\text{-N}$. Takto vázaný dusík je zodpovědný za nitrifikační pochody v půdě, které mají významný vliv na tvorbu tolik důležitých bakterií, které pozitivně ovlivňují příjem dusíku, respektive minerálů do rostliny.

Zemská atmosféra je největším rezervoárem dusíku, neboť obsahuje kolem 78 obj. % plynného dusíku v podobě molekuly N_2 , který se podílí na funkci celého ekosystému. Vzhledem k tomu, že oblast výzkumu dizertační práce je zaměřena na pozemní (terestriální) ekosystém, následující odstavce budou věnovány tomuto tématu.

Terestriální ekosystém (Obr. 38) reprezentuje koloběh plynného dusíku N_2 . Ten se z atmosféry váže do půdy, ve které se oxidačními procesy přeměňuje na iontovou formu (NO_3^-) a (NH_4^+). Rostliny jsou schopny takto transformovaný dusík absorbovat prostřednictvím svých kořenů. Proces přechodu plynného dusíku do podoby iontů absorbovaných v půdě je zprostředkován tzv. diazotrofií (biologická fixace dusíku). Jedná se o proces rozpadu trojné vazby vzdušného dusíku, která je způsobena navázáním bakterií produkujících nitrogenázové enzymy. Některé typy těchto bakterií žijí přímo v kořenech uzlin luštěnin (fazolí a hrášku), čímž dopomáhají ke zvýšení produkce enzymů [40].

Odumřelé zbytky rostlin a uhynulých zvířat, které jsou nositeli DNA (aminokyselin a proteiny), dochází k jejich rozkladu prostřednictvím aerobních a anaerobních bakterií (tzv. amonizační bakterie) a také prostřednictvím hub. Výsledkem jejich působení je produkce plynného amoniaku (NH_3), respektive amoniových iontů (NH_4^+) jako vedlejší produkt rozkladu. Tento rozklad nazýváme jako amonifikace [41].



Obr. 38 Schéma cyklu dusíku v terestriálním ekosystému [40].

Ovšem určitá část amoniaku, respektive amoniových iontů je přeměněna nitritačními bakteriemi (*Nitrosolobus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*) aerobní povahy nejdříve na dusitany (NO_2^-) a dále nitritačními bakteriemi (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*) na dusičnany (NO_3^-). Tento proces je nazýván jako nitrifikace (oxidace amoniaku) a je to tedy děj probíhající za přítomnosti kyslíku. Dále následuje proces asimilace, ve které se dusičnany (NO_3^-) zabudovávají do aminokyselin, proteinů a celkové DNA rostlin, která je živočichy přijímána ve formě potravy. Dusičnany se rovněž začleňují do molekul chlorofylu [41].

Avšak ne všechny dusičnany (NO_3^-) se podílí na asimilaci, značná část z nich je rozkládána denitrifikačními bakteriemi (anaerobní bakterie) zpět na plynný dusík, respektive oxid dusný. Tím dochází k jeho návratu do atmosféry. Celý tento proces přeměny nazýváme denitrifikací a probíhá bez přístupu vzduchu [40].

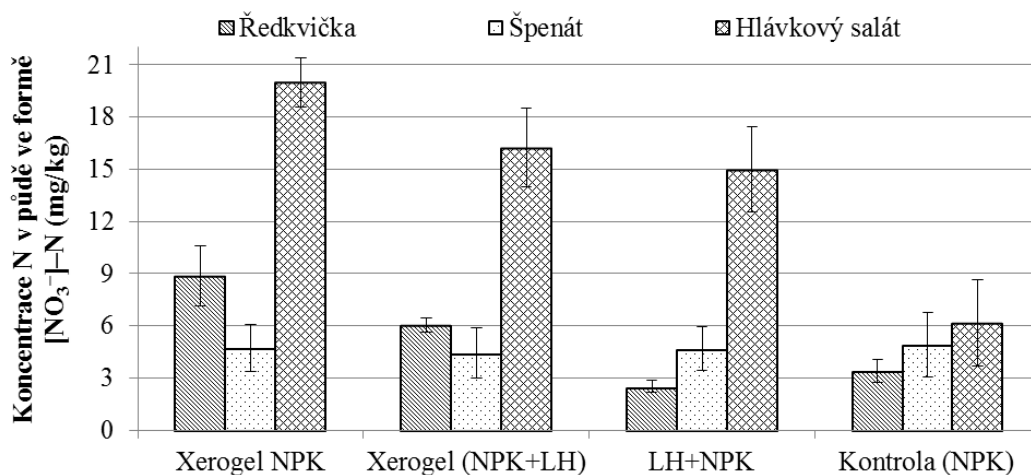
Dusík hraje významnou roli při tvorbě nadzemní části zelených rostlin. Podílí se na růstu výhonků a tvorbě listů [42]. Příznivě ovlivňuje také produkci rostlin a jejich kvalitu [43]. Nedostatek dusíku naopak způsobuje zpomalení růstu nadzemní části rostliny [44], žloutnutí starých listů, jejich odumírání a opadání. Plody jsou při jeho nedostatku malé [45]. Nadbytek dusíku se projevuje velkými, vodnatými listy, tmavozelené až namodralé barvy [42]. Stejně tak se podepisuje na snížené kvalitě plodů. Na nadbytek dusíku jsou v raném stádiu vegetace citlivé převážně rostliny salátu, zelí, květáku, brukve atd. [46].

V publikaci [47] bylo uvedeno, že limitní tolerance dusíku vázaného v půdě ve formě $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$ a $[\text{NH}_4^+]\text{-N}$ by se měla v hrubých typech půd pohybovat v rozmezích 10–90 mg/kg, ve středně hrubých půdách okolo 60–270 mg/kg a v jemných půdách mezi 90–260 mg/kg. Vyšší koncentrace můžou intoxikovat půdu, potraviny a následně i pitné zdroje půdy.

Výsledky stanovení $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$ v ošetřených půdách

Maximální koncentrace $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$ v použitých plodinách nabývá následujících limit, pro ředkev setou 339 mg/kg, hlávkový salát 569–1 017 mg/kg a špenát 565–791 mg/kg [48]. Uvedené limity koncentrací udávají maximální možnou koncentraci, která je pro člověka ještě nezávadná.

Výsledky koncentrací $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$ ve vzorcích půdy jsou zobrazeny v grafu (Obr. 39). Z grafu je patrné, že superabsorbenty dosahují v případě ředkvičky seté a hlávkového salátu vyšších koncentrací $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$ než v případě půd ošetřených lignohumátem draselným a NPK nebo pouze NPK. Naopak v případě špenátu setého nebylo zaznamenáno žádného významného rozdílu v koncentracích $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$ v závislosti na způsobu ošetření půdy. Z toho vyplývá, že většina dusíku vázaného na dusičnanové anionty byla využita rostlinou, neboť ho byla schopna lépe vstřebávat a využít pro svůj růst. To potvrzují i výsledky poměrů [44] hmotností sušiny nadzemní části listů a kořenového systému (Tab. 7), kde právě vzorky špenátu odpovídají 1, tedy rovnoměrnému zastoupení hmotností. To je zřejmé i z grafů (Obr. 33, Obr. 34 a Obr. 35).



Obr. 39 Koncentrace dusíku v půdě ve formě $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$ v závislosti na použitém přípravku.

V případě ředkvičky ošetřené hydrogely nabývala maximální průměrná koncentrace $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$ hodnot 9 mg/kg, což bylo 3krát více než v případě kontrolních vzorků. Pro hlávkový salát ošetřený xerogely byla maximální průměrná koncentrace $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$ 20 mg/kg, což bylo 3,3krát více než v případě kontroly. Z těchto výsledků vyplývá, že superabsorbenty přispívají ke zvýšení obsahu dusičnanů v půdě v malých množstvích, což je pozitivní z hlediska produkce prospěšných nitrifikačních bakterií. Navíc nedochází ke zbytečné intoxikaci půdy dusičnany, neboť naměřené hodnoty koncentrací $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$ v půdě byly velmi nízké. Navíc, pokud by rostlinou bylo přijato veškeré

množství dusičnanů, potom by koncentrace v plodině nebyly rizikové, což je velmi pozitivní z hlediska dopadů na lidské zdraví.

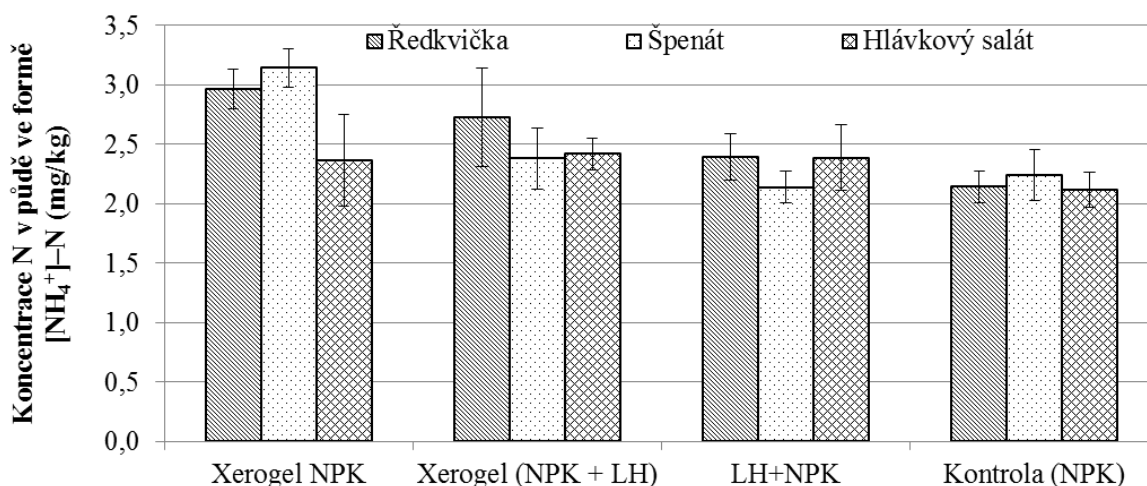
Tab. 7 Poměry hmotností sušiny nadzemní části rostliny a kořenů.

	Ředkvička	Špenát	Hlávkový salát
Xerogel (NPK)	0,3	1,3	5,2
Xerogel (NPK+LH)	0,4	1,0	3,9
LH+NPK	0,5	1,0	4,1
Kontrola (NPK)	0,6	1,0	2,5

Výsledky stanovení v ošetřených půdách $[\text{NH}_4^+]\text{-N}$

Jak již bylo uvedeno v odstavcích výše, dusík je v půdě vázán také ve formě amoniových iontů $[\text{NH}_4^+]\text{-N}$, jejichž koncentrace byla rovněž stanovena. Výsledky byly vyneseny do grafu (Obr. 40), z nichž je zřejmé, že mírně vyšších koncentrací $[\text{NH}_4^+]\text{-N}$ bylo dosaženo v případě půd ošetřených xerogely s NPK. Ostatní vzorky dosahovaly v rámci statistické chyby stejných výsledků. To znamená, že všechny aplikované přípravky se podílely na zvýšení amonifikačních bakterií. Navíc na základě uvedených hodnot, kde průměrná maximální koncentrace $[\text{NH}_4^+]\text{-N}$ odpovídá 3,1 mg/kg je jasné, že tato koncentrace není tak vysoká a nemohla by tak způsobovat toxicitu půdy či potravin.

Naopak uvedené výsledky poukazují na to, že půdy ošetřené vybranými přípravky způsobují vyšší produkci žádaných bakterií a transformaci vytvořeného $[\text{NH}_4^+]\text{-N}$ na další produkty zejména $[\text{NO}_3^-]\text{-N}$. Vznik škodlivých (NO_2^-) nebo nitroaminů v případě xerogelových přípravků byl vyloučen na základě senzitivních testů **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..** Pokud by byly hydrogely toxické, nedošlo by k vzejití tolika zasetých semen a toxicita by se negativně projevila i na samotných rostlinách.



Obr. 40 Koncentrace dusíku v půdě ve formě $[\text{NH}_4^+]\text{-N}$ v závislosti na použitém přípravku.

9 ZÁVĚR – EXPERIMENTÁLNÍ A VÝSLEDKOVÁ ČÁST II

Druhá část předložené dizertační práce se věnuje poznatkům získaných na Monash University v Austrálii, kde jsem absolvovala vědeckou stáž podpořenou Mezinárodní huminovou společností

(IHSS) formou cestovního grantu. Cílem bylo naučit se správné technice pěstování rostlin ve skleníkových zařízeních, reprodukovat tyto znalosti na stěžejní materiál dizertační práce, kterým byl lignohumát draselný, přípravek od firmy Amagro s.r.o. a superabsorbenty připravené na FCH VUT v Brně. Dále bylo důležité naučit se správnému vyhodnocení a interpretaci dat.

Tyto znalosti byly využity při studiu vlivu SAP přípravků s/ bez přídavku LH, respektive pouze použití LH do půdy a porovnání s kontrolním vzorkem. Experimenty byly realizovány pro 3 druhy plodin – ředkvička setá, hlávkový salát a špenát setý. Výsledkem těchto experimentů bylo, že superabsorbenty s i bez přídavku LH mají pozitivní vliv na výnosnost rostlin, neboť přípravky použité u všech rostlin se projeví stejně, větším vzrůstem plodů, listů a rozvětvenějším kořenovým systémem. To se samozřejmě podepsalo i na vyšší hmotnosti výnosu ve srovnání s rostlinami, které byly ošetřeny pouze LH s NPK a pouze NPK.

Lepší výnosy byly pozorovatelné již od prenatalního stádia rostlin, neboť došlo ke vzrůstu 60 a více % semen, které již po 14 dnech vykazovaly obecně lepší vlastnosti a na pohled se jevíly vitálnější. Po dokončení experimentů byly výsledky stejně tak kvalitní, půdy ošetřené SAPs vedly k výnosu velkých, zdravých rostlin. Více o povaze přípravků prozradila podrobná analýza půdy, díky níž bylo možné usoudit, zda zvolené přípravky a koncentrace jsou prospěšné nebo naopak škodlivé.

V první řadě byly provedeny základní měření pH a elektrické vodivosti, kde na základě výsledků bylo zjištěno, že pH půdy v případě SAPs preparátů se pohybují okolo 6,3 až 6,4. V případě použití práškových přípravků LH s NPK, respektive pouze NPK bylo zjištěno, že půda byla slabě kyselá, dosahovala hodnoty pH 5,4. Na základě rozdílného pH je možné usuzovat, že použité plodiny prospívají více v případě neutrálních půd, které jsou více bohaté na prvky N, P a K než slabě kyselých půd, kterým zejména prvky N a P chybějí.

Dalším studovaným parametrem byla elektrická vodivost, která byla mírně zvýšená u půd s obsahem SAPs, což mohlo být zapříčiněno draselnými ionty. Při výrobě SAPs produktů jsou totiž využívány draselné soli. Ačkoli elektrická vodivost byla u SAPs půd mírně vyšší, nepřekračovala kritickou hodnotu (2 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

Půdy byly rovněž podrobeny měření dusíku vázaného v podobě dusičnanů a amonných kationtů. Tento vázaný dusík totiž blahodárně působí na tvorbu nitrifikačních a amonifikačních bakterií, které jsou prospěšné pro růst rostlin a vytváří vhodné prostředí pro tvorbu mikroorganismů. Ovšem musí být jejich hodnota v povolené míře, například odborná literatura uvádí, že v půdě by nemělo být přítomno více než 10–270 mg/kg dusičnanů v závislosti na typu půdy a rovněž by neměla být přesažena hodnota 340–1020 mg/kg dusičnanů v plodech rostlin, což může mít negativní vliv na lidské zdraví. Vzhledem k tomu, že v rámci provedených analýz bylo dosaženo v půdě po sklizni kolem 20 mg/kg dusíku vázaného přes dusičnany a 3 mg/kg dusíku vázaného přes amonné kationty, pak bylo dodrženo potřebných limitů pro splnění požadavků. Přípravky používané coby půdní kondicionéry tak mohou být označeny jako nezávadné.

V poslední řadě byly provedeny tzv. inkubační testy, které jsou realizovány pouze na půdě a použitých preparátech. Díky těmto experimentům bylo možné stanovit chování látek v půdě a jejich vliv na tvorbu nežádoucích skleníkových plynů. Z dosažených výsledků bylo zjištěno, že přípravky měly pozitivní vliv na tvorbu dusíku. pH i elektrická vodivost půdy byly v povolených limitech. Naopak bylo zjištěno, že velmi blahodárné účinky na vznik nitrifikačních a amonifikačních bakterií mají především superabsorbenty bez ohledu, zda obsahovaly LH či nikoli.

Závěrem dizertační práce je, že použité přípravky superabsorbentů mají pozitivní vliv na růst rostlin a tvorbu vhodného prostředí pro bakterie a mikroorganismy. Bohužel na základě provedených experimentů nebylo potvrzeno, že by lignohumát draselný měl významnější vliv na funkci a vitalitu rostlin, což mohlo být zapříčiněno tím, že tento typ látky se používá ve vyšších koncentracích v prvních stádiích růstu rostliny, což nebylo dodrženo, ani nebylo dodrženo vhodné dávkování dané výrobcem, aby bylo dosaženo stejných koncentrací pro všechny preparáty po celou dobu

experimentu. Není vyloučeno, že v případě použití jiných (vyšších) koncentrací by se účinky potvrdily.

10 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ORGELL, W. H. The Isolation of Plant Cuticle with Pectic Enzymes. *PLANT PHYSIOLOGY*. 1955, vol. 30, issue 1. DOI: 10.1104/pp.30.1.78.
- [2] SCHREIBER, Lukas a Jörg SCHÖNHERR. *Water and solute permeability of plant cuticles: measurement and data analysis*. Springer, c2009, xiii, 299 p. ISBN 35-406-8945-1.
- [3] DARLINGTON, W. A., CIRULIS, N. Permeability of Apricot Leaf Cuticle. *Plant Physiology*. 1962, p. 462–467. DOI: 10.1104/pp.38.4.462.
- [4] EDGINGTON, Lloyd, Heinrich BUCHENAUER, Friedrich GROSSMANN a J. SCHÖNHERR. *Bioassay and transcuticular movement of systemic fungicides*. *Pesticide Science*. 1973, vol. 4, issue 5, IV-1-752. DOI: 10.1016/b978-0-08-023930-9.50166.
- [5] SOLEL, Z., Heinrich BUCHENAUER, Friedrich GROSSMANN a J. SCHÖNHERR. *Transcuticular Movement of Fungicides*. *Phytopathology*. 1973, vol. 63, issue 4, IV-1-752. DOI: 10.1094/Phyto-63-1151.
- [6] WANG, CJ and ZQ, LIU. Foliar uptake of pesticides – Present status and future challenge. *Pesticide Biochem. And Physiol.*, 2007, vol. 87, pp. 1-8. DOI: 10.1016/j.pestbp.2006.04.004.
- [7] YU, J.H., LIM, H.K., COI, G.J., CHO, K.Y., KIM, J.H. A new method for assessing foliar uptake of fungicides using Congo Red as a tracer. *Pest.Manag. Sci.* 2001, r. 57, s. 564-569. DOI: 10.1002/ps.327.
- [8] OPARKA, K.J. a ROBERTS, A.G. Plasmodesmata. A not so open-and-shut case. *Plant Physiol.* 2001, r. 125, s. 1233-126. DOI: 10.1104/p.125.1.123.
- [9] BAUER, H. a J. SCHÖNHERR. Determination of mobility of organic compounds in plant cuticles and correlation with molecular volumes. *Pestic. Sci.* 1992, r. 35, s. 1-11. DOI: 10.1002/ps.2780350102.
- [10] BAUER, E. A., GRAYSON a J. SCHÖNHERR. Polydisperse ethoxylated fatty alcohol surfactants as accelerators of cuticular penetration. 1. Effects of ethoxy chain length and the size of the penetrants. *Pestic. Sci.* 1997, r. 51, s. 131 – 152. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9063(199710)51:2<131::AID-PS614>3.0.CO;2-D.
- [11] BAKER, E. A., HAYES, A. L. a R. C. BUTLER. Physicochemical properties of agrochemicals: their effects on foliar penetration. *Pestic. Sci.* 1992, r.34, s. 167-182. DOI: 10.1002/ps.2780340212.
- [12] SANTIER, Simone, André CHAMEL, Friedrich GROSSMANN a J. SCHÖNHERR. Reassessment of the role of cuticular waxes in the transfer of organic molecules through plant

- cuticles. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1998, vol. 36, issue 3, IV-1-752. DOI: 10.1016/s0981-9428(97)86879-9.
- [13] ZELENÁ, V., VEVERKA, K. *Effect of Surfactants and Liquid Fertilisers on Transcuticular Penetration of Fungicides*. *Plant Protect. Sci.* 2007, vol. 43, no. 4: 151-156. DOI: 10.17221/2236-PPS.
- [14] SOLEL, Z, Lloyd EDGINGTON. Transcuticular Movement of Fungicides. *Phytopathology*. 1972, vol. 63, issue 4. DOI: 10.1094/phyto-63-505.
- [15] OKUDA, A., KAWASAKI, T., YAMDA, Y. Foliar absorption of nutrients I: The Effect of Different Phosphorus Compounds and pH on Foliar Absorption by Use of Radioactive Isotopes. 1960, *Soil and Plant Food*, vol. 6, issue 2. DOI: 10.1080/00380768.1960.10430928.
- [16] YAMADA, Y., WITTWE, SH., BUKOVAC, MJ. Penetration of Ions through Isolated Cuticles. *Plant Physiol*, 1963, vol. 39, issue 1., pp.28-32. DOI:10.21273/JASHS.119.4.761.
- [17] HINSVARK, O. N., WITWERT, S. H. a H. B., TUKEY. The metabolism of foliar-applied urea. I. Relative rates of C¹⁴O₂ production by certain vegetable plants teated with labelled urea. *Plant Physiol*. 1953, r. 28, s. 70-76. DOI: 10.1104/pp.28.1.70.
- [18] YAMADA, Y., WITWERT, SH, BUKOVAC, MJ. Penetration of Organic Compounds Through Isolated Cuticular Membranes with Special Reference to C¹⁴ Urea. *Plant Physiol*. 1964, vol. 40, issue 1, pp. 170-175. DOI: 10.1104/pp.40.1.170.
- [19] CHAMEL, A and N., VITTON. Sorption diffusion of ¹⁴C-atrazine through isolated plant cuticles. *Chemosphere*, 1996, vol. 33, issue 6, pp. 995-1003. DOI: 10.1016/0045-6535(96)00241-X.
- [20] CHAMEL, A and GAMBONNET, N. Sorption and diffusiom of an ethoxylated stearic alcohol and an ethoxylated stearic amine into and through isolated plant cuticles. *Chemosphere*, 1997, vol. 34, issue 8, pp. 1777-1786. DOI: 10.1016/s0045-6535(97)00033-7.
- [21] ZEISLER-DIEHL, V. V., MIGDAL, B., SCHREIBER, L. Quantitative characterization of cuticular barrier properties: methods, requirements, and problems. *Journal of Experimental Botany*. 2017, vol. 55, p. DOI:10.1093/jxb/erx389.
- [22] ŠANTRŮČEK, J., ŠIMÁŇOVÁ, E., KARBULKOVÁ J., ŠIMKOVÁ, M., SCHREIBER, L. A new technique for measurement of water permeability of stomatal cuticular membranes isolated from *Hedera helix* leaves. *Journal of Experimental Botany*. 2004, vol. 55, i. 401, p. 1411–1412. DOI:10.1093/jxb/erh150.
- [23] SCHLEGEL T. K., SCHÖNHERR, J., SCHREIBER, L. Size selectivity of aqueous pores in stomatous cuticles of *Vicia faba* leaves. *Planta*. 2005, vol. 221, p. 648–655. DOI: 10.1007/s00425-005-1480-1.

- [24] SCHÖNHERR, J. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany*. 2006, vol. 56'7, p. 2471–2491.
- [25] FERNANDEZ, S., OSORIO, S., HEREDIA, A. Monitoring and visualising plant cuticles by confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiol. Biochem.* 1999, vol. 37, i. 10, p. 789–794. DOI:10.1016/S0981-9428(00)86692-9.
- [26] SHIRLEY, B. W. Flavonoid biosynthesis: ‚new‘ functions for an ‚old‘ pathway. *Trends Plant Sci.* 1, 1996, p. 281–377. DOI:10.1016/S1360-1385(96)80312-8.
- [27] BAKER, E. A., BUKOVAC, M. J., HUNT, G. M. Composition of tomato fruit cuticle as related to fruit growth and development. In: Cutler D. F., Alvin K. L., Price C. E. (Eds.), *The Plant Cuticle* Academic Press, London, 1982, p. 33–44. DOI:10.1071/FP08018.
- [28] BUCHHOLZ, A., BAUR, P., SCHÖNHERR, J. Differences among plant species in cuticular permeabilities and solute mobilities are not caused by differential size selectivities. *Planta* 206. 1998, p. 322–328. DOI: 10.1007/s004250050407.
- [29] CONSIDINE, J. A., KNOX, R. B. Development and histochemistry of the cells, cell walls and cuticle of the dermal system of fruit of the grape, *Vitis vinifera* L. *Protoplasma*. 1979, vol. 99, p. 347–365. DOI: 10.1007/BF01275807.
- [30] FRICKER, M. D., CHOW, C. M., ERRINGTON, R. J., MAY, M., MELLOR, J., MEYER, A. J., TLALKA M., VAUX, D. J., WOOD, J., WHITE, N. S. Quantitative imaging of intact cells and tissues by multidimensional confocal fluorescence microscopy. *Exp. Biol. Online* 2, 1997, 19, <http://link.springer.de>.
- [31] HUTZLER, P., FISCHBACH, R., HELLER, W., JUNGBLUT, T. P., REUBER, S., SCHMITZ, R., VEIT, M., WEISSENBÖCK, G., SCHNITZLER, J. P. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Bot.* 49. 1998, p. 953–965. DOI:10.1093/jexbot/49.323.953.
- [32] SCHREIBER, L. Review of sorption and diffusion of lipophilic molecules in cuticular waxes and the effects of accelerators on solute mobilities. *Journal of Experimental Botany*. 2006, vol 57., s. 2515–2523. DOI: 10.1093/jxb/erj173.
- [33] SCHÖNHERR, J. Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. *Planta*. 2000, vol. 212, p. 112–118. DOI: 10.1007/s004250000373.
- [34] SCHÖNHERR, J. Water permeability of isolated cuticular membranes: The effect of pH and cations on diffusion, hydrodynamic permeability and size of polar pores in the cutin matrix. *Planta*. 1976, vol 128, p. 113–126. DOI: 10.1007/BF00390312.
- [35] SCHREIBER, L. Polar paths of diffusion across plant cuticles: new evidence for an old hypothesis. *Annals of Botany*. 2005, vol 95, p. 1069–1073. DOI: 10.1093/aob/mci122.

- [36] MACURÁKOVÁ, Viktória. Půdní hydrogely fungující na principu řízeného uvolňování. Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně. Bakalářská práce. Vedoucí: Ing. Romana Kratochvílová. 2017, p. 37.
- [37] iReceptář.cz Jak měřit a upravovat pH půdy: kyselá, neutrální či zásaditá? [5.7.2010] Copyright © VLTAVA LABE MEDIA a.s., 2018. Autorská práva vykonává vydavatel. ISSN: 1805-9465. © 2018 VIZUS | Používáme redakční systém Vizus CMS. <https://www.ireceptar.cz/zahrada/okrasna-zahrada/jak-merit-a-upravovat-ph-pudy-kysel-neutralni-ci-zasadita/>
- [38] Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Environmental and Ecological chemistry – Volume II. Chapter in book: MERRY, R. H. *Acidity and alkalinity of soils*. 2009, s. 115–132. ISBN 978-1-84826-206-5.
- [39] JAROŠOVÁ, M. Úloha huminových látek ve zmírňování negativních dopadů působení solí na rostliny ječmene jarního. Dizertační práce. Mendelova univerzita. 2015, Brno. Vedoucí práce prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D.
- [40] Douglas Wilkin, Ph.D. and Jean Brainard, Ph.D. Nitrogen Cycle. Introduces the pathways through which nitrogen is recycled through the biosphere. CK-12 Foundation. Vytvořeno 12.12.2015, poslední úpravy 17.6.2017. <https://www.ck12.org/biology/nitrogen-cycle/lesson/The-Nitrogen-Cycle-Advanced-BIO-ADV/>
- [41] GILLIAM, P. PMG Biology - Biology posts related to EdExcel IGCSE specification. 4.10 Bacteria of the Nitrogen Cycle: A*understanding for GCSE Biology. 12.4.2014. <https://pmgbiology.com/2014/04/12/bacteria-of-the-nitrogen-cycle-a-understanding-for-gcse-biology/>.
- [42] NEUBERG, J. Hnojení a výživa rostlin na zahradě. Praha: Grada, 1998, s. 152. ISBN 80-7169-496-7.
- [43] MALÝ, I. Polní zelinářství. Praha: Agrospoj, 1998, s. 196. ISBN 80-239-4232-8.
- [44] PROCHÁZKA, S. a MACHÁČKOVÁ, I. Fyziologie rostlin. Praha: Academia, 1998, s. 484, ISBN 80-200-0586-2.
- [45] TORMA, S. Dusík. Nenahraditelný prvek v půdě a rostlině. *AGRO*, 2005, 10(1), 27–29.
- [46] VANĚK, V. Výživa a hnojení – polních a zahradních plodin. Praha: Martin Sedláček, 2002, s. 132. ISBN 80-902413-7-9.
- [47] ENSLEY, S. a BARNHART, S.K. Nitrate toxicity. Iowa Beef Center, Iowa State University. 2012, 50, s. 3.
- [48] Sbírka zákonů. Česká republika. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 53. Ročník 22, 2002, s. 866–984.

- [49] CRANK, J. The mathematics of diffusion. 2nd Ed. Oxford: Oxford University Press, c 1975, viii, 414 p. ISBN 05-215-6477-8.

11 ŽIVOTOPIS

Jméno a příjmení	Marcela Smilková, rozená Laštůvková
Titul	Ing.
Datum a místo narození	3.4.1990 v Moravské Třebové
Email	marcela.smilkova@gmail.com

VZDĚLÁNÍ

2019–nyní	Hartmann-Rico a.s. Pozice: Výrobní technolog
2014–nyní	Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně Obor: Fyzikální chemie Typ studia: magisterské (zakončeno státní závěrečnou zkouškou, titul Ing.)
2012–2014	Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně Obor: Fyzikální chemie Typ studia: magisterské (zakončeno státní závěrečnou zkouškou, titul Ing.)
2009–2012	Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně Obor: Spotřební chemie Typ studia: bakalářské (zakončeno státní závěrečnou zkouškou, titul Bc.)

STUDIJNÍ POBYTY A ZAHRANIČNÍ KONFERENCE

II-IV/2018	Johannes Kepler University Linz, Polymer Institute ERASMUS
IX/2017	Johannes Kepler University Linz, Polymer Institute AKTION
VIII–X/2017	Monash University, School of Chemistry, Melbourne, Australia IHSS Training Award – intership
XI/2016	Johannes Kepler University Linz, Polymer Institute AKTION
IX/2016	18th Meeting of the International Humic Substances Society, Kanazawa, Japan IHSS Travel Support and training Awards – presentation and poster session, student grant

11.1 PŘEHLED PUBLIKACÍ

11.2 Publikace v impaktovaných časopisech

TRUDIČOVÁ, M.; SMILEK, J.; KALINA, M., SMILKOVÁ, M., ADÁMKOVÁ, K., HRUBANOVÁ, K., KRZYZANEK, V.; SEDLÁČEK, P. Multiscale experimental evaluation of agarose-based semi-interpenetrating polymer network hydrogels as materials with tunable rheological and transport performance. *POLYMERS*, 2020, roč. 12, č. 11, s. 1-27, ISSN 20734360, DOI 10.3390/polym12112561.

SMILKOVA, M; SMILEK, J., KALINA., KLUCAKOVA, M.; PEKAR, M., SEDLACEK P. A simple technique for assessing the cuticular diffusion of humic acid biostimulants. *PLANT METHODS*, 2019, roč. 15, č. 1, s. 83. ISSN: 17464811.

KLUČÁKOVÁ, M.; KALINA, M.; SMILEK, J.; LAŠTŮVKOVÁ, M. The transport of metal ions in hydrogels containing humic acids as active complexation agent. *COLLOIDS AND SURFACES A-PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS*, 2018, roč. 557, č. 1, s. 116-122. ISSN: 1873-4359.

SMILEK, J.; SEDLÁČEK, P.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; KALINA, M.; KLUČÁKOVÁ, M. Transport of Organic Compounds Through Porous Systems Containing Humic Acids. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, roč. 3, č. 98, s. 373-377. ISSN: 0007-4861.

SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J.; KALINA, M.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; KLUČÁKOVÁ, M. HYDROGELS: Invaluable Experimental Tool for Demonstrating Diffusion Phenomena in Physical Chemistry laboratory Courses. *Journal of Materials Education*, 2017, roč. 39, č. 1-2, s. 59-90. ISSN: 0738-7989.

11.3 Konferenční příspěvek – indexované publikace ve Scopus, Web of Knowledge

KLUČÁKOVÁ, M.; SMILKOVÁ, M., SEDLÁČEK, P. Transport of lignohumate through plant cuticle – Method of diffusion couple with barrier on the interface. *Proceedings 11th Anniversary International Conference on Nanomaterials - Research and Application 16th - 18th October 2019*. 1st Edition, 2019. Keltickova 62, 710 00 Ostrava, Czech Republic, EU: TANGER Ltd., Ostrava, 2019. s. 304-309. ISBN: 978-808729495-6.

SMILEK, J.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; MACHÁČEK, O.; ROUPEC, J. Study on Stability of Magnetorheological Fluids Stabilized by Surface Active Agents. *Proceedings 10th Anniversary International Conference on Nanomaterials - Research and Application October 17th - 19th 2018*. 1st Edition, 2018. Keltickova 62, 710 00 Ostrava, Czech Republic, EU: TANGER Ltd., Ostrava, 2018. s. 75-75. ISBN: 978-80-87294-85-7.

LAŠTŮVKOVÁ, M.; SMILEK, J.; KALINA, M.; KRÁČALÍK, M.; KRATOCHVÍLOVÁ, R.; PEKAŘ, M. Characterization of hydrogels by macro and microrheological techniques. In *Nanocon Conference Proceeding*. 1st edition 2017. Ostrava, Česká republika: TANGER Ltd., 2016. s. 792-797. ISBN: 978-80-87294-71-0.

LAŠTŮVKOVÁ, M.; SMILEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P. Characterization of hydrogels for diffusion experiments. In *7th International Conference on Nanomaterials - Research and Application*. 1. Ostrava: Tanger, Ltd., 2015. s. 90-95. ISBN: 978-80-87294-63-5.

LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. Penetration of fertilizers based on humic substances through plant cuticles. *Nanocon 2014 Conference proceedings*. Ostrava: 2014. s. 125-125. ISBN: 978-80-87294-55-0.

11.4 Konferenční příspěvek – speciální čísla

LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. Jednoduché difuzní metody pro studium penetrace kapalných huminových přípravků do listů. Czech chemical society symposium series. Praha, Česká republika: Czech chemical Society Symposium Series, 2016. s. 73-73. ISSN: 2336-7202.

SMILEK, J.; KALINA, M.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; TÜRKEOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; KLUČÁKOVÁ, M. Reactivity- mapping tool based on diffusion techniques for characterization of biocolloids. Materials Science Forum, 2015, roč. 9, č. 851, s. 130-134. ISSN: 0255-5476.

KALINA, M.; SMILEK, J.; KRATOCHVÍLOVÁ, R.; KRŇÁVKOVÁ, Š.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; KLUČÁKOVÁ, M. Study of agarose gelation process by unconventional dynamic light scattering method. Czech Chemical Society Symposium Series, 2015, roč. 13, č. 2, s. 81-84. ISSN: 2336-7210.

TÜRKEOVÁ, I.; ENEV, V.; KLUČÁKOVÁ, M.; KROUSKÁ, J.; LAŠTŮVKOVÁ, M. Thermodynamics of Metal Ion Interaction with Humic Acids. Czech Chemical Society Symposium Series, 2015, roč. 13, č. 2, s. 149-151. ISSN: 2336- 7210.

LAŠTŮVKOVÁ, M.; TÜRKEOVÁ, I.; SMILEK, J.; SEDLÁČEK, P.; KRATOCHVÍLOVÁ, R.; SCHMIEDOVÁ, V.; KLUČÁKOVÁ, M. Morphology of Plant Cuticles as The Limiting Barriers for the Uptake of Fertilizers. Czech Chemical Society Symposium Series, 2015, roč. 13, č. 2, s. 93-96. ISSN: 2336- 7210.

11.5 Konferenční příspěvek – abstrakt ve sborníku

LAŠTŮVKOVÁ, M.; SMILEK, J.; VLACHOVÁ, K.; OHAREK, L.; MACHÁČEK, O.; ROUPEC, J. Preparation of magnetorheological fluids and effect of additives on their stability. Book of Abstracts of 32nd Conference of The European Colloid and Interface Society - ECIS2018. Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana. Ljubljana, Slovenia: Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana, 2018. s. 224-224. ISBN: 978-961-6756-90-7.

SMILEK, J.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; VLACHOVÁ, K.; OHAREK, L.; KARGEROVÁ, A.; MACHÁČEK, O.; ROUPEC, J. Sedimentation analysis of magnetorheological fluids stabilized by amphiphilic compounds by analytical centrifuge. Book of Abstracts of 32nd Conference of The European Colloid and Interface Society - ECIS2018. Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana. Ljubljana, Slovinsko: ECIS, 2018. ISBN: 978-961-6756-90-7.

LAŠTŮVKOVÁ, M.; SMILEK, J. Complex characterization of agarose hydrogels. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018. Book of abstracts. Purkyňova 464/118, 612 00 Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. s. 81-81. ISBN: 978-80-214-5488-0.

JARÁBKOVÁ, S.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; JUGL, A.; VELCER, T.; SMILEK, J. Preparation and research of cosmetic emulsions from solid TiO₂ and emulsions prepared from dispersion of TiO₂. 7th Meeting on Chemistry nad Life 2018. Book of abstracts. Ing. Petr Dzik, Ph.D. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2018. s. 77-77. ISBN: 978-80-214-5488-0.

KALINA, M.; SMILEK, J.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P. Relationship between structure and viscoelastic properties of reactive polyelectrolyte hydrogels. 9th European Symposium on Biopolymers: Book of Abstracts. 1. Toulouse, Francie: 2017. s. 124-124.

LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. The Characterization of Plant Cuticles and Their Usage in Simple Diffusion Processes for Simulation of Foliar Fertilizers. Kanazawa, Japan: Kanazawa, University, 2016. s. 25-26.

SMILEK, J.; SEDLÁČEK, P.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; KALINA, M.; KLUČÁKOVÁ, M. New methods of study of reactivity and barrier properties of biocolloids. Rome, Itálie: 2016. s. 331-331.

- LAŠTŮVKOVÁ, M.; SMILEK, J.; SEDLÁČEK, P.; KLUČÁKOVÁ, M. Effect of Lipophilic Membrane on Penetration of Potassium Lignohumate. In XVI. Workshop of physical chemists and electrochemists Book of abstracts. 1. Masaryk University, Brno, Czech Republic: MUNI press, 2016. s. 172-175. ISBN: 978-80-210-8267- 0.
- KLUČÁKOVÁ, M.; SMILEK, J.; KALINA, M.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P. Transport properties of hydrogels based on humic substances. Proc. 18th International Conference of International Humic Substances Society. Kanazawa: Kanazawa University, 2016. s. 1-2.
- LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; KLUČÁKOVÁ, M.; SMILEK, J. Characterization of plant cuticles for a study of foliar fertilizers. CEITEC Ph.D. Retreat. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2015. s. 62-62. ISBN: 978-80-210-7825- 3.
- SMILEK, J.; SEDLÁČEK, P.; KALINA, M.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; KLUČÁKOVÁ, M. Barrier properties of natural biopolymers studied by innovative diffusion techniques. Ceitec PhD Retreat. 1. Brno: 2015. s. 76-76. ISBN: 978-80-210-7825- 3.
- LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J.; TÜRKEOVÁ, I.; KLUČÁKOVÁ, M. Study of morphology the isolated cuticle from Prunus laurocerasus. In Sborník abstraktů 3. prosince 2015 - Studentská konference Chemie je život. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. s. 263-269. ISBN: 978-80-214-5290- 9.
- LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J. Studium transportu huminových látek skrz rostlinné kutikuly. Sborník anotací bakalářských a diplomových prací o přírodě, krajině a environmentálně příznivém životním stylu. Brno: 2014. s. 27-27. ISBN: 978-80-87604-68- 7.
- LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. Optimization of transport liquid substances through natural porous material. Frontiers in Material and Life Sciences. Brno: CEITEC, 2014. s. 167-167. ISBN: 978-80-210-7159- 9.
- LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. Simple diffusion techniques for determination of substances penetrated through plant cuticles. In Chemie je život - Studentská konference. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. s. 315-321. ISBN: 978-80-214-5078- 3.
- LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; PEKAŘ, M. Penetration of dissolved humic fertilizers to leaves studied by simple diffusion technique. ECIS 2013 Abstracts - Complex Fluids and Environmental Colloid Science. Sofia, Bulgaria: 2013. s. 1 (1 s.).
- LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J. Využití difúzních technik pro studium transportu lignohumátů přes rostlinné kutikuly. In Studentská konference Chemie je život Sborník příspěvků. Brno: FCH VUT, 2013. s. 109-114. ISBN: 978-80-214-4823- 0.
- SEDLÁČEK, P.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; KLUČÁKOVÁ, M.; PEKAŘ, M.; SMILEK, J. Simple Technique for Modeling Transcuticular Transport of Liquid Humates in Leaves. HiT 2012 Conference Second International Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies - Abstracts. Moskva: Lomonosov MSU, 2012. s. 48-48.
- LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J. Návrh a testování metody studia transportu kapalných humátů skrz rostlinné kutikuly. In Studentská konference Chemie je život - Sborník příspěvků. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2012. s. 168-174. ISBN: 978-80-214-4425- 6.

ABSTRAKT

Předložená disertační práce se zabývá studiem transportu kapalných zemědělských přípravků na bázi lignohumátu draselného skrze rostlinné kutikuly. Práce se zabývá optimalizací a správným matematickým popisem difúzních experimentů. Transportní experimenty byly realizovány v modelových hydrogelových médiích na bázi inertní agarózy dvěma způsoby – volná difúze lignohumátu do hydrogelu a difúzní pár (hydrogel-hydrogel), kde jeden z hydrogelů byl obohacen o lignohumát. Jako porézní přepážka byla použita kutikula, jakožto hlavní bariéra na povrchu listů, izolovaná z listů rostliny bobkovišně lékařské.

Cílem práce bylo charakterizovat bariérové vlastnosti kutikul, které jsou hlavní překážkou pro vstup lignohumátu do listů při foliárním hnojení. Toto se řešilo prostřednictvím difúzních experimentů a jejich matematickým popisem, jehož součástí bylo stanovení efektivních difúzních koeficientů. Ty se pak použily pro modelování koncentračních profilů v hydrogelech a srovnání s experimentálními daty. Značná část práce se věnuje fyzikálně-chemickým vlastnostem rostlinných kutikul a hydrogelových materiálů použitých jako modelové difúzní prostředí. Tyto charakteristiky jsou následně dávány do souvislosti s transportními vlastnostmi zkoumanými v těchto materiálech.

Rostlinné kutikuly byly izolovány z listů *Prunus laurocerasus* a charakterizovány dostupnými metodami zejména s ohledem na jejich strukturu a prostup pro lignohumát. Hydrogely, coby modelová difúzní média, byly charakterizovány s ohledem na mechanické vlastnosti (reologie), morfologické vlastnosti (porozita) a strukturní vlastnosti (rastrovací elektronová mikroskopie). Uvedené vlastnosti mají přímou souvislost s transportními procesy probíhajícími v těchto materiálech.

Druhá část předložené disertační práce je zaměřená na interpretaci výsledků získaných ze skleníkových experimentů, při nichž byly využity superabsorbenty vyvinuté na Fakultě chemické, Vysokého učení technického v Brně a lignohumát draselný dodaný spolupracujícím podnikem Amagro s.r.o.

Cílem bylo aplikovat lignohumát přímo na rostliny a sledovat vliv jeho aplikace na růst rostlin, pokud bude rostlinou přijímán z půdy skrz kořen. Výsledky těchto experimentů by měly potvrdit pozitivní vliv na růst a vývoj rostlin, což je základní předpoklad pro jeho případnou foliární aplikaci.

Z výsledků difúzních experimentů vyplývá, že přes abaxiální kutikuly lépe penetrují látky ve srovnání s adaxiálními kutikulami, a že transport lignohumátu draselného probíhá z hlediska kinetiky rychleji přes chemicky izolované než enzymaticky izolované kutikuly. Z druhé části disertační práce je patrné, že superabsorbenty mají významný vliv na růst, vývoj a kvalitu rostlin, a že přispívají k tvorbě vhodných podmínek pro funkci mikroorganismů a bakterií, které podporují funkci půdy.

ABSTRACT

Doctoral Thesis is aimed on the transport of liquid preparations chemically based on potassium lignohumate through plant cuticles commonly utilized in agricultural applications. Firstly, the thesis deals with optimization and correct mathematical description of diffusion experiments. Transport (diffusion) experiments have been realized in model hydrogel media based on linear polysaccharide – chemically inert agarose. Diffusion experiments have been realized by two independent approaches (diffusion models) – free diffusion of lignohumate in hydrogel and diffusion pair (hydrogel-hydrogel), where one of these was enriched by lignohumate in contrast with the second one. Plant cuticle, as the major barrier on the leaves, isolated from *Prunus laurocerasus*, was used as porous membrane in diffusion experiments.

The main aim of Ph.D. thesis was the characterization of barrier properties of cuticles, which are the most limiting barrier regulating the transport of lignohumate in/out the leaves during foliar fertilization. These experimental problems have been solved by diffusion experiments and by their proper mathematical description, especially by the determination of fundamental diffusion parameters such as effective diffusion coefficients. These parameters have been used for the modelling of concentration profiles in hydrogels and comparison with experimental data. Significant part of thesis is aimed on the determination of physico-chemical properties of plant cuticles and hydrogels matrixes utilized as model diffusion environment. These characteristics are subsequently correlated with transport (diffusion) parameters.

Plant cuticles have been isolated from *Prunus laurocerasus* leaves and then were characterized by relevant instrumentation notably with respect to their structure and penetration through of lignohumate. Hydrogels have been characterized with respect to mechanical (viscoelastic) (rheology), morphological e.g. porosimetry) and structural (scanning electron microscopy) properties. Mentioned properties have direct link to transport processes ongoing in these materials.

Next part of doctoral thesis is aimed on the proper and correct interpretation of experimental results obtained from glass-house experiments. During these experiments, hydrogels based on superabsorbent polymers developed on Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, have been used together with commercial preparation – potassium lignohumate kindly provided by co-working commercial subject – Amagro s.r.o. The main aim was the application of lignohumate directly on plants through root system. Results of these experiments should confirm the positive effect on plant growth as well as their positive development.

Results obtained from transport/diffusion experiments confirm that the penetration of active compounds (lignohumate) is more efficient in comparison with adaxial cuticles. The kinetics of lignohumate transport is faster for abaxial cuticles. From superabsorbent experiments it is obvious that these play significant role in growth and development of plant and simultaneously positively contribute to creation of suitable conditions for proper microbiological and bacterial activity, which is essential for health soil.