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 — **Ing. Marcela Smilková**

AUTHOR

ŠKOLITEL — **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**

SUPERVISOR

BRNO 2021

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

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. MartinaKlučáková, Ph.D. vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař,CSc. vedoucí ústavu

prof. Ing. Martin Weiter,Ph.D.
děkan

V Brně dne 1.9.2020

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.

KLÍČOVÁ SLOVA

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

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.

KEY WORDS

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

SMILKOVÁ, Marcela. *TRANSPORTU HUMINOVÝCH LÁTEK SKRZ ROSTLINNOU KUTIKULU*. Brno, 2021. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/137452. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martina Klučáková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

…….

Ing. Marcela Smilková

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala své vedoucí dizertační práce prof. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za vedení, cenné rady, čas a energii, kterou mi věnovala po celou dobu studia a rovněž trpělivost při sepisování této práce. Mé poděkování rovněž patří kolegům Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. a Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za cenné rady, konzultace a podnětné připomínky při řešení experimentální i písemné části DSP. Rovněž velké poděkování celému týmu FCH VUT za kolegialitu a psychickou podporu.

Speciální poděkování patří celé mé rodině a manželovi Jiřímu, kteří mě po celou dobu nesmírně podporovali a měli se mnou trpělivost.

OBSAH

1 ÚVOD 12
2 TEORETICKÁ ČÁST 13
2.1 Huminové látky 13
2.1.1 Úvod do problematiky huminových látek 13
2.1.2 Rozdělení a charakterizace huminových látek 14
2.1.3 Vznik huminových látek 16
2.1.4 Teorie vzniku huminových látek 17
2.2 Huminové kyseliny, jejich charakteristika a struktura 18
2.2.1 Využití huminových kyselin 19
2.3 Gelové systémy 20
2.3.1 Úvod do problematiky gelových systémů 21
2.3.2 Vznik gelových systémů 21
2.3.3 Klasifikace gelových systémů 21
2.3.4 Vlastnosti gelových struktur 22
2.3.5 Využití gelových systémů 24
2.4 Agaróza 24
2.4.1 Využití agarózy 25
2.5 Superabsorbenty 26
2.5.1 Obecný úvod 26
2.5.2 Příprava gelů s polyelektrolytovými sítěmi 27
2.5.3 Vlastnosti SAPs materiálů 29
2.5.4 Aplikace a uplatnění SAPs materiálů 30
2.6 Stavba rostlin 31
2.6.1 Struktura listu 31
2.7 Kutikula 32
2.7.1 Obecné poznatky o rostlinné kutikule 32
2.7.2 Struktura rostlinné kutikuly 33
2.7.3 Transport agrochemikálií (hydrofilních roztoků) listovým povrchem 36
2.8 Foliární hnojení 39
2.8.1 Klasifikace hnojiv 40
2.8.2 Přehled použitých komerčních materiálů na bázi huminových látek 42
2.9 Difúzní procesy 43
2.9.1 Obecné principy difúzních procesů 43
2.9.2 Fickovy zákony 44

2.9.3 Jednoduché difúzní modely 45
2.9.4 Difúzní koeficient a jeho stanovení 50
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 52
3.1 Metody izolace rostlinných kutikul 52
3.1.1 Enzymatická metoda izolace 52
3.1.2 Chemická metoda izolace 54
3.2 Studium transportu kapalných látek přes rostlinné kutikuly 54
3.3 Studium vlastností rostlinných kutikul 61
3.3.1 Interpretace FT-IR spekter rostlinných kutikul 61
3.3.2 Vizualizace kutikul metodou skenovací konfokální laserová mikroskopie 63
3.3.3 Rastrovací elektronová mikroskopie rostlinných kutikul 63
3.4 Studium vlastností agarózových hydrogelů 65
3.4.1 Studium porozity hydrogelových systémů 65
4 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE 68
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST I 70
5.1 Použité chemikálie 70
5.1.1 Enzymatická metoda izolace rostlinných kutikul 70
5.1.2 Enzymatická metoda izolace rostlinný kutikul 70
5.1.3 Příprava agarózových hydrogelů 70
5.2 Použité přístroje 71
5.2.1 Charakterizace rostlinných kutikul 71
5.2.2 Charakterizace hydrogelových materiálů 71
5.2.3 Měření difúzních experimentů 71
5.2.4 Difúzní experimenty přes syntetické membrány 71
5.3 Izolace rostlinných kutikul 72
5.3.1 Chemická metoda izolace kutikul 72
5.3.2 Enzymatická metoda izolace kutikul 73
5.4 Charakterizace rostlinných kutikul 74
5.4.1 Příprava vzorků pro optickou mikroskopii a fluorescenční mikroskopii 74
5.4.2 Příprava vzorků pro mikroskopii doby života fluorescence (FLIM) 74
5.4.3 Příprava vzorků pro rastrovací elektronovou mikroskopii (SEM) 75
5.4.4 Příprava vzorků pro mechanickou profilometrii 76
5.4.5 Isotermální mikrokalorimetrie (IMC) 76
5.4.6 Měření kontaktního úhlu povrchu rostlinných kutikul 76
5.5 Příprava agarózových hydrogelů 77

5.6 Charakterizace agarózových hydrogelů 77
5.6.1 Rtuťová porozimetrie 78
5.6.2 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) 78
5.6.3 Reologie agarózových hydrogelů 78
5.7 Příprava difúzních experimentů 79
5.7.1 Difúze z roztoku 79
5.7.2 Difúze ze zdrojového hydrogelu 80
6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST II 81
6.1 Použité chemikálie 81
6.1.1 Příprava skleníkových experimentů 81
6.1.2 Příprava inkubačních testů 81
6.1.3 Extrakce půdy 81
6.1.4 Stanovení dusíku v půdě v podobě $\mathbf{NH4+-N}$ 81
6.1.5 Stanovení dusíku v půdě v podobě $\mathbf{NO3--N}$ 82
6.1.6 Stanovení fosforu v půdě tzv. Colwell P 82
6.2 Použité přístroje 83
6.2.1 Skleníkové experimenty 83
6.2.2 Příprava půdních vzorků 83
6.2.3 Inkubační testy 83
6.3 Úvod k experimentální části II 84
6.3.1 Příprava vzorků pro skleníkové experimenty 84
6.3.2 Příprava půdy 84
6.3.3 Příprava květináčů a nastavení podmínek experimentů 85
6.3.4 Jednocení rostlin a průběžné hodnocení 86
6.3.5 Sklizeň rostlin 88
6.3.6 Stanovení vlhkosti půdy, elektrické vodivosti v půdě a pH 88
6.3.7 Stanovování $\mathbf{NO3-}$–N, $\mathbf{NH4+}$–N a Colwell P v půdě 89
6.4 Inkubační testy 92
6.4.1 Příprava vzorků a nastavení podmínek 92
6.4.2 Odebírání vzorků a jejich měření na plynové chromatografii (GC) 94
6.4.3 Stanovení vlhkosti, elektrické vodivosti a pH u inkubačních vzorků 95
6.4.4 Stanovování $\mathbf{NO3-}$—N a $\mathbf{NH4+}$–N ve vzorcích inkubačních testů 95
7 VÝSLEDKY A DISKUZE – EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST I 96
7.1 Charakterizace rostlinných kutikul 96
7.1.1 Optická mikroskopie 96

7.1.2 Fluorescenční mikroskopie 97
7.1.3 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) 98
7.1.4 Mechanická profilometrie 102
7.1.5 Stanovení velikosti stomat 103
7.1.6 Stanovení doby života fluorescence (FLIM) 103
7.1.7 Isotermální mikrokalorimetrie (IMC) 108
7.1.8 Smáčivost povrchu rostlinných kutikul 114
7.2 Charakterizace hydrogelových matric a komerčních produktů 116
7.2.1 Charakterizace lyofilizovaných hydrogelů rtuťovou porozimetrií 116
7.2.2 Rastrovací elektronová mikroskopie lyofilizovaných hydrogelů 117
7.2.3 Reologie hydrogelů 118
7.2.4 Obecná charakteristika lignohumátu draselného 119
7.2.5 Rastrovací elektronová mikroskopie Lignohumátu A 119
7.3 Difúzní experimenty 120
7.3.1 Vizuální zhodnocení transportních experimentů (nestacionární difúze) 120
7.3.2 Vyhodnocení difúzních experimentů pro teplotu 25 °C 122
7.3.3 Vyhodnocení difúzních experimentů pro teplotu 35 °C 126
7.3.4 Vyhodnocení difúzních experimentů pro teplotu 45 °C 128
7.3.5 Porovnání a souhrn výsledků difúzní experimentů přes rostlinné kutikuly pro teploty 25, 35 a 45 °C 129
7.3.6 Srovnávací difúzní experimenty (gel-gel difúzní pár) 131
7.3.7 Difúzní experimenty realizované přes syntetické membrány s póry o velikosti 10 µm při teplotě 25 °C pro model nestacionární difúze (difúzní pár) 132
7.3.8 Vyhodnocení experimentů difúze z roztoku při teplotě 25 °C 132
7.3.9 Difúzní experimenty realizované přes syntetické membrány s póry o velikosti 10 µm při teplotě 25 °C pro model difúze z roztoku 133
8 ZÁVĚR – EXPERIMENTÁLNÍ A VÝSLEDKOVÉ ČÁSTI I 135
9 VÝSLEDKY A DISKUZE – EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST II 137
9.1 Vliv aplikovaných přípravků na vzrůst a kondici rostlin 137
9.1.1 Počet vzrostlých rostlin 137
9.2 Sklizeň a charakterizace rostlin 137
9.2.1 Ředkvička setá 138
9.2.2 Špenát setý 140
9.2.3 Hlávkový salát 142
9.2.4 Stanovení vlhkosti půdy skleníkových experimentů 144
9.2.5 Objasnění dosažených výsledků z této kapitoly 146

9.3 Analýza půdy po sklizni rostlin 147
9.3.1 Stanovení pH ve vzorcích půdy 147
9.3.2 Stanovení elektrické vodivosti ve vzorcích půdy 148
9.3.3 Stanovení dusíku v půdě ve formě [$NO3^-$]–N a [$NH4^+$]–N 149
9.4 Inkubační testy 152
9.4.1 Stanovení oxidu uhličitého a oxidu dusného 152
9.4.2 Stanovení pH a elektrické vodivosti 155
9.4.3 Stanovení dusíku v půdě ve formě [$NO3^-$]–N a [$NH4^+$]–N 156
10 ZÁVĚR – EXPERIMENTÁLNÍ A VÝSLEDKOVÁ ČÁST II 158
11 POUŽITÁ LITERATURA 160
12 SEZNAM ZKRATEK 177
13 PŘÍLOHY 179
14 VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST 185
14.1 Publikace v impaktovaných časopisech 185
14.2 Konferenční příspěvek – indexované publikace ve Scopus, Web of Knowledge 185
14.3 Konferenční příspěvek – speciální čísla 186
14.4 Konferenční příspěvek – abstrakt ve sborníku 186
14.5 ABSOLVOVANÉ STÁŽE 188
14.6 ABSOLVOVANÉ ZAHRANIČNÍ KONFERENCE 188
14.7 OSTATNÍ ZAHRANIČNÍ AKTIVITY 189
15 PLNÉ VERZE IMPAKTOVANÝCH ČASOPISŮ 189

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 stimulátory 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. stimulátory 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, stimulátory růstu, živiny, minerály aj.) do listů je tenká vrstva pokrývající povrch celé a každé rostliny tzv. kutikula. Tato přírodní bariéra je tvořená převážně z látek lipofilního charakteru – kutinu, 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 preparátů 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 přebytečného 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 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Huminové látky

Předložená disertační práce se zabývá přípravky s obsahem huminových látek, které jsou uvedeny pod komerčním názvem lignohumát draselný neboli lignohumát A (LH), proto je tomuto tématu věnována jedna z hlavních kapitol. Zde jsou popsány obecné informace o huminových látkách, jejich frakcích a o rozdílech ve struktuře a vlastnostech jednotlivých frakcí. Závěr kapitoly je věnován aplikacím huminových látek a jejich využití.

2.1.1 Úvod do problematiky huminových látek

V historických monografiích byly huminové látky (HL) mylně spojovány buď jen s oblastí neživé přírody, které bylo možné připravit na základě analytických extrakcí, nebo pouze s živou přírodou, tedy látkami vyskytujícími se v půdě, řekách, jezerech, oceánech a jejich sedimentech. Tyto dvě protichůdné definice způsobily značné rozpory mezi vědci. Přitom HL jsou majoritní složkou půdní organické hmoty, která je odvozena od půdní biomasy a je tedy tvořená jak živými, tak neživými organickými látkami. Právě organická frakce, jakožto jedna z nejdůležitějších částí půdy, má značný význam zejména v zemědělství, kde se svými účinky zřetelně podílela a stále podílí na fyzikálních, chemických a biologických změnách půdy a růstu rostlin. Rovněž bylo zjištěno, že půdy obohacené o HL mají významný vliv na růst rostlin a úrodnost půdy [1].

Pod pojmem půdní organická hmota (angl. *soil organic matter* – SOM) rozumíme rostlinné a živočišné zbytky v různých fázích rozkladu, mikrobiální biomasy a ve vodě rozpustné organické látky. Výše uvedené komponenty půdy mají odlišné tendence podléhat mikrobiálnímu rozkladu, což nám poskytuje možnost pochopit mechanismus obohacování půd o živiny (C, K, N, S, P a mikroelementy např. B, Mn, Cu, Zn, aj., což jsou esenciální látky ovlivňující růst rostlin a kvalitu půdy). Tento pochod může být ovlivňován zejména změnami v půdním prostředí (změna pH, iontová nerovnováha, apod). Významnou roli zde hraje přirozený koloběh uhlíku v půdě, kdy v některých procesech se uhlík může asimilovat na mikrobiální části tkáně, a tím tak vytvořit tzv. *stabilní humus* [2].

V prvních odstavcích je popsáno, co všechno půda obsahuje. A jak to všechno souvisí s huminovými látkami? Právě tyto látky jsou nedílnou součástí organické hmoty v půdě, které vznikají v důsledku složitých aerobních mikrobiologických procesů zahrnujících chemické, fyzikální a biologické transformace převážně rostlinných a živočišných zbytků. Tento proces samovolné přeměny je často uváděn pod názvem *humifikace* [2]. Tímto složitým pochodem dochází ke vzniku interakcí mezi některými polárními a nepolárními látkami, které mají za následek ovlivňování biologické dostupnosti některých důležitých živin (stopové prvky, aminokyseliny, lipidy, aj.). Velký význam zde také hraje stupeň humifikace, polymerizace a oxidace, který se výrazně podepisuje na chemických a fyzikálních vlastnostech těchto látek [2].

Na základě dalších výzkumů bylo prokázáno, že HL nemusí nutně vznikat pouze rozkladem organických látek, nýbrž také biosyntetickými procesy. *Ghabbour* et al. [3] dokázali izolovat HL z hnědých řas (latinsky *Pilayella littoralis*) a *Radwan* et al. [4] potvrdili přítomnost těchto látek v dalších mořských rostlinách.

Výskyt huminových látek je velmi rozsáhlý, neboť byla jejich přítomnost prokázána například v rašelině, lignitu, černém i hnědém uhlí a také v ropě. Dále byla přítomnost těchto látek stanovena v nižších koncentracích v přírodních vodách a sedimentech. Studie HL byla provedena také v Antarktidě, kde v místních půdách byla taktéž potvrzena jejich existence. V těchto nepříznivých podmínkách vznikají HL naprosto odlišným a specifickým procesem humifikace, který je dán právě

rozdílnými klimatickými podmínkami od ostatních kontinentů. Na základě těchto zmíněných skutečností můžeme HL zařadit mezi jedny z nejrozšířenějších sloučenin přírodního charakteru na Zemi [5].

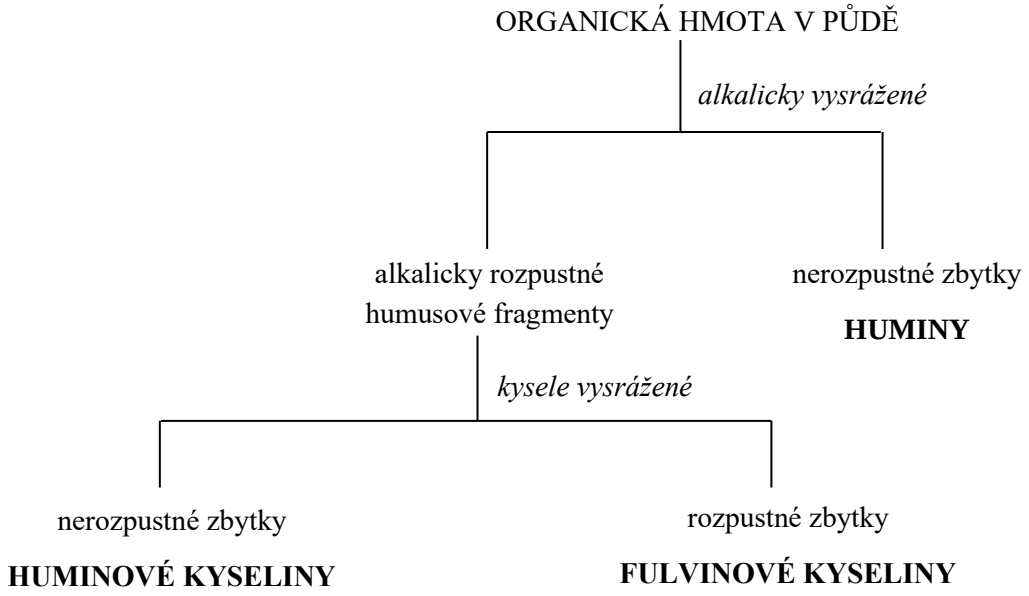
Huminové látky představují klíčovou složku organické hmoty půdy. Jejich zastoupení může kolísat v rozsahu několika setin procent (písek, jíly), jednotek procent (běžné zeminy) až dokonce několika desítek procent (rašelina, lignit). V těchto materiálech mohou být HL zastoupeny až z 85 hm. % [6], [7]. Huminové látky se taktéž velmi významně podílejí na koloběhu uhlíku, neboť z celkového zastoupení uhlíku na Zemi, HL tvoří 80 hm. % v terestrických a 60 hm. % v rozpuštěných vodních médiích [8].

I přesto, že huminovým látkám, zejména huminovým kyselinám, je věnována poměrně velká pozornost, stále se tyto látky řadí mezi jedny z nejméně prozkoumaných přírodních materiálů vůbec. Zájem o jejich vznik, strukturu, vlastnosti a chování je předmětem dlouhodobého a intenzivního výzkumu mnohých vědeckých skupin po celém světě.

2.1.2 Rozdělení a charakterizace huminových látek

První studie zabývající se původem a chemickým charakterem huminových látek vypracoval *Sprengel* v roce 1839 [9]. Do klasifikace těchto látek velmi výrazně přispěl také ve stejném roce švédský vědec *Berzelius* [10], který prokázal přítomnost rozpuštěných HL v přírodních vodách. Z minerálních vod se mu podařilo izolovat žlutou frakci huminových látek tzv. fulvinové kyseliny (FK). Pokračovatelem Berzeliovy teorie se stal *Mulder*, který se také zabýval rozdělením huminových látek a vlastnostmi jednotlivých frakcí. Mimo jiné také přispěl k rozšíření poznatků o jejich rozpustnosti.

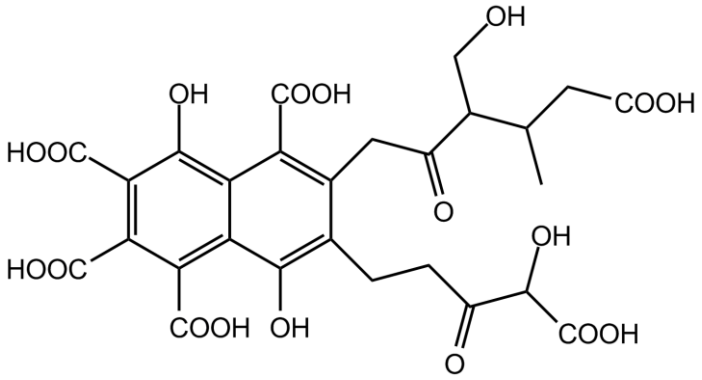
V první polovině 20. století se široká vědecká obec začala zabývat popisem huminových látek a jejich chemickou povahou a strukturou. Do této problematiky významně přispěl vědec německého původu *Oden* [11], který rozdělil huminové látky do následujících skupin: *uhelný humus, huminové kyseliny* (HK), *hymatomelanové kyseliny a fulvinové kyseliny*. Tato charakterizace látek byla velmi blízká popisu HL, jak ji známe dnes a za uplynulá desetiletí došlo k rozšíření nových poznatků o HL zejména v oblasti struktury, fyzikálních a chemických vlastností a aplikací těchto látek v praxi.



Obr. 1 Klasifikace jednotlivých frakcí huminových látek dle rozpustnosti [12].

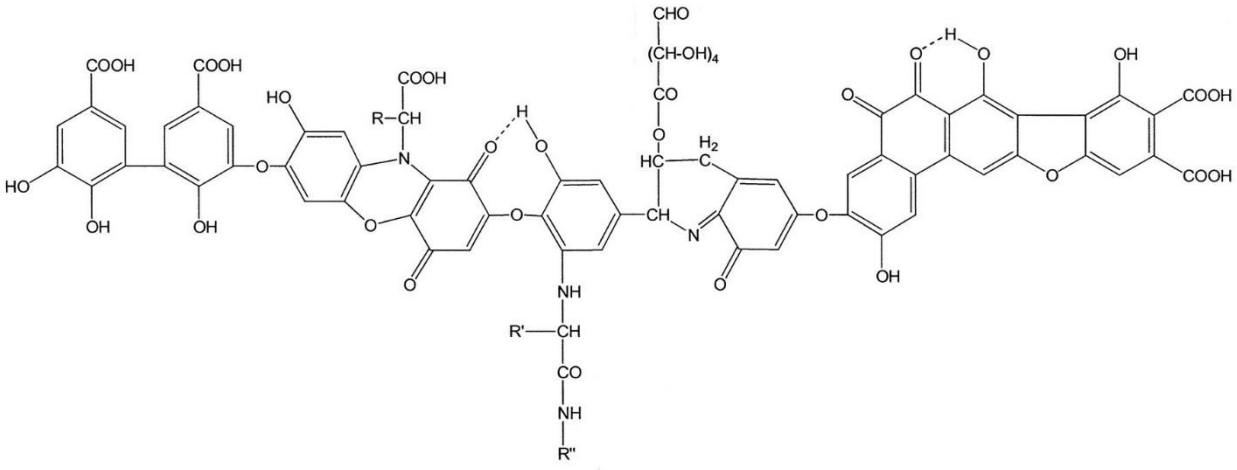
Následující vývoj poznatků o HL vedl k jejich rozdělení do dnešní podoby. Ve skutečnosti se jedná pouze o propracovanější formu dělení huminových látek, kterou navrhl *Berzelius* (1839), a které jsou založeny na odlišné acidobazické rozpustnosti huminových sloučenin. Frakce HL jsou následující: *fulvinové kyseliny*, *huminové kyseliny a huminy* (HU). Přehled klasifikace jednotlivých frakcí huminových sloučenin je znázorněn ve schématu, který je uveden na Obr. 1.

Fulvinové kyseliny (Obr. 2) jsou frakcí huminových látek, které jsou rozpustné v celém rozsahu pH, tedy jak v kyselém, tak bazickém prostředí.



Obr. 2 Struktura fulvinových kyselin (FK) podle Stevensona [2].

Huminové kyseliny (Obr. 3) jsou látky rozpustné v alkalických roztocích, avšak nerozpustné v roztocích kyselého charakteru. V kyselém prostředí dochází ke vzniku koagulátů HK, přičemž musí být dodržena podmínka, že hodnota pH roztoku bude menší než 2, tedy bude dosahovat hodnoty izoelektrického bodu huminových kyselin [13]. S rostoucí hodnotou pH totiž dochází k postupné disociaci nejdříve karboxylových a následně fenolických skupin. Na základě zmíněných zkušeností můžeme říct, že rozpustnost huminových kyselin souvisí také s mírou disociace funkčních skupin obsažených v základním skeletu molekuly.



Obr. 3 Hypotetická struktura huminových kyselin dle Stevensona [2].

Ačkoli huminové kyseliny jsou charakteristické svojí nerozpustností v kyselých prostředích, respektive v roztocích s pH nižším než 2, podle *Odena* [11] existuje „podfrakce“ HK, která je nazývána *hymatomelanové kyseliny* (HMK). Tato frakce huminových látek se vyznačuje svojí schopností rozpouštět se v zásaditých prostředích a vysrážet se v prostředích kyselých, čímž se velmi podobají HK, avšak na rozdíl od huminových kyselin jsou tyto látky navíc rozpustné v alkoholech.

Poslední frakcí jsou huminy, což jsou všechny ostatní nerozpustné frakce přítomné v půdních organických materiálech. Tyto sloučeniny nelze převést do roztoku žádnou acidobazickou úpravou.

Huminové látky jsou směsí různorodých komponent, které jsou tvořeny ze stejných stavebních jednotek organických materiálů (C, H, O a N). Tyto prvky jsou v HL přítomny bez ohledu na jejich původ [1]. Chemické struktury jednotlivých frakcí si jsou sice blízké, avšak z hlediska jejich chemických a fyzikálních vlastností se značně odlišují [14]. Některé typické vlastnosti HL vystihuje tabulka s barevným schématem (Obr. 4).

Obr. 4 Vlastnosti a klasifikace huminových látek [2].

Hlavní odlišností jednotlivých frakcí HL, která je zřejmá z tabulky (Obr. 4), je jejich barevnost. Fulvinové kyseliny vykazují žluté až žlutohnědé zbarvení, zatímco huminové kyseliny jsou tmavě hnědé, v některých případech až hnědo-šedé. Nejtmavším barevným odstínem se vyznačují nerozpustné zbytky huminových látek – huminy, které jsou tmavě šedé až černé.

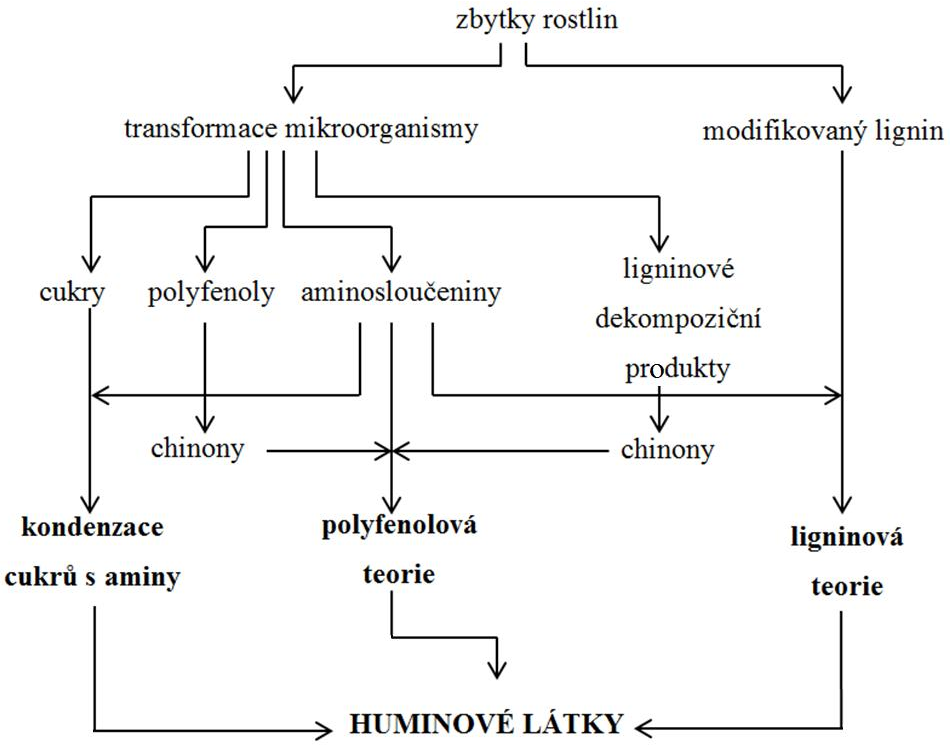
Z uvedených údajů (Obr. 4) jsou rovněž patrné rozdíly v molekulových hmotnostech jednotlivých frakcí, například fulvinové kyseliny se vyznačují molekulovou hmotností v řádech stovek až tisíců daltonů. Fulvinové kyseliny disponují nejnižší molekulovou hmotností, tudíž lze tyto látky zařadit mezi tzv. *nízkomolekulární frakce huminových látek*. Růst molekulové hmotnosti dále pokračuje přes huminové kyseliny až k huminům. Tyto sloučeniny jsou poté nazývány jako *vysokomolekulární frakce huminových látek*. Tato skutečnost je dána rozdílnou strukturou, odlišným počtem aromatických cyklů nebo funkčních skupin (karboxylová, hydroxylová apod.) u obou těchto frakcí a v neposlední řadě také stupněm polymerizace.

Z výše uvedených informací je zřejmé, jaké je zastoupení obsahu uhlíku a kyslíku v jednotlivých frakcích. Z Obr. 4 je patrné, že množství uhlíku roste od fulvinových kyselin k huminům, což je dáno právě vzrůstajícím počtem uhlíkatých cyklů ve struktuře jednotlivých frakcí huminových látek. Zastoupení kyslíku naopak klesá od fulvinových kyselin směrem k huminům, protože FK disponují vyšším počtem funkčních skupin ve své struktuře, zejména se jedná o karboxylové, hydroxylové a ketonické skupiny. Jak to všechno souvisí s kyselostí? Fulvinové kyseliny se vyznačují vyšším počtem hlavně karboxylových funkčních skupin, které jsou nositelem kyselých vodíků, proto se tato frakce huminových látek chová kyseleji ve srovnání s huminovými kyselinami a huminy.

2.1.3 Vznik huminových látek

Biochemické procesy vzniku huminových látek byly studovány už od doby jejich objevení německým vědcem *Achardem* na konci 18. století [15]. Následně byly a stále jsou studovány po dlouhá léta, avšak přesný mechanismus vzniku HL nebyl stále objasněn a nadále je velkou neznámou. Huminové sloučeniny jsou velmi složité systémy, které se vyvíjí na základě transformace rostlinných a živočišných zbytků (humifikace) v přítomnosti mikrobiálního působení (kapitola 2.1.1). Proces

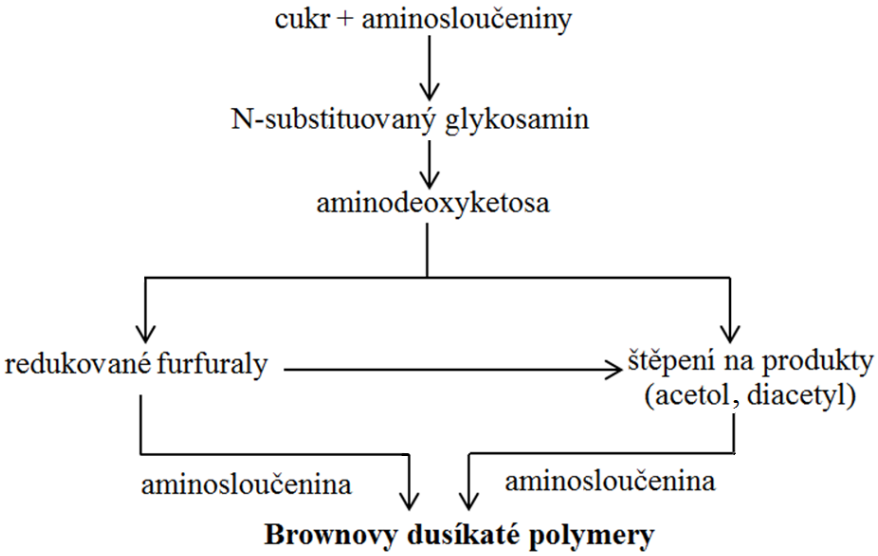
humifikace byl proto popsán celou řadou teorií, zmíněny však budou pouze tři nejznámější a nejpoužívanější. Obecné schéma vzniku huminových sloučenin a jednotlivých drah je uvedeno na Obr. 5 [16].



Obr. 5 Celkový přehled vzniku huminových látek [2].

2.1.4 Teorie vzniku huminových látek

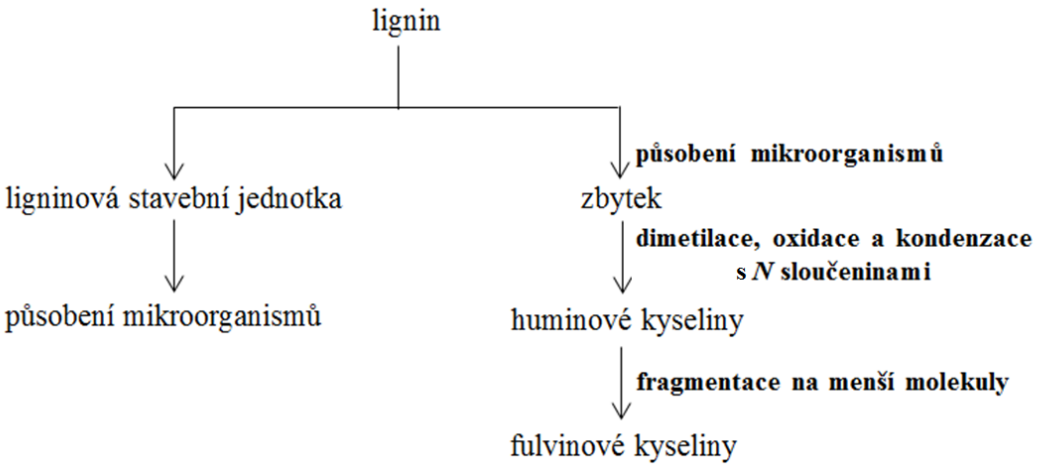
První teorie se označuje jako tzv. *Millardova kondenzace sacharidů s aminy* [17]. Tento vznik huminových sloučenin je založen na tvorbě nízkomolekulárních látek ze sacharidů a proteinů vlivem působení mikroorganismů. Ty rozloží složitější biopolymerní látky na cukry a aminokyseliny, které dále podléhají oxidaci, kondenzaci a následné polymerizaci. (Obr. 6) [18].



Obr. 6 Mechanismus Millardovy kondenzace sacharidů s aminy [18].

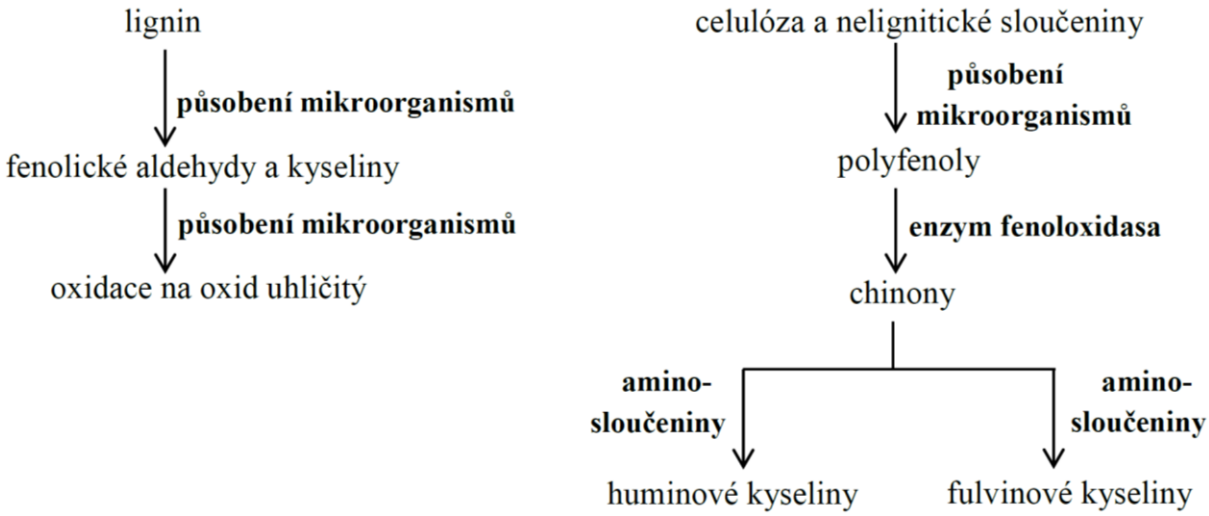
Druhou teorií je *Waksmanova ligninová teorie* [19], která byla popsána již v roce 1932. Podle ní modifikované kationty v ligninu ztrácejí methoxylové skupiny a vedou ke generaci *o*-hydroxyfenolů

a oxidací alifatických postranních řetězců za tvorby karboxylových skupin. Budeme-li uvažovat, na základě dalších teorií, že HL jsou polymerní systémy, potom by výsledkem byly huminy s huminovými a fulvinovými kyselinami, které by vznikly následnou oxidací a fragmentací [18]. Podrobnější znázornění mechanismu ligninové teorie je uvedeno na Obr. 7.



Obr. 7 Schéma ligninové teorie [18].

Poslední a zároveň nejvíce uznávanou teorií popisující vznik HL se stala tzv. *Flaigova polyfenolová teorie* [19]. Výchozím materiálem v tomto mechanismu jsou nízkomolekulární látky, které kondenzací a polymerací přechází ve velké molekuly. Jedna cesta vychází z ligninu, jehož fenolické aldehydy a kyseliny jsou mikrobiálně atakovány a vedou k přeměně na chinony. Ty podléhají polymerizaci za vzniku huminových makromolekul. Druhý přístup spočívá v tom, že polyfenoly jsou syntetizovány mikroorganismy např. z celulózy a ty jsou enzymaticky oxidovány na chinony a v závěru převedeny na huminové látky (Obr. 8) [18].



Obr. 8 Mechanismus polyfenolové kondenzace [18].

2.2 Huminové kyseliny, jejich charakteristika a struktura

Studovaným materiálem předložené práce je lignohumát draselný obsahující huminové látky, o jejichž obecných vlastnostech již bylo psáno v kapitole 2.1.2. Zde byly HK hlavně srovnávány s dalšími frakcemi huminových látek, proto tato kapitola bude věnována významu, vlastnostem a použití huminových kyselin. Ty hrají rovněž významnou roli v komerčních produktech společnosti Amagro s.r.o. (lignohumát draselný), které jsou používány v disertační práci pro difúzní experimenty.

Základními stavebními prvky HK jsou uhlík, vodík, kyslík a dusík. Zastoupení těchto elementů není však vždy stejné, mění se s procesem vzniku a s původem huminových kyselin, proto nelze HK popsat jedním strukturním vzorcem [20]. Na základě dosavadního výzkumu stále nebyla přesně určena struktura těchto složitých látek, ale je zřejmé, že jejich fyzikální a chemické vlastnosti budou odlišné od ostatních frakcí huminových látek. Díky svým vynikajícím, všestranným vlastnostem jsou huminové kyseliny hojně využívány v různých průmyslových, zemědělských či vědeckých oblastech, o čemž pojednává kapitola 2.2.1. Základní charakteristikou huminových sloučenin je prvkové složení (Tab. 1).

Tab. 1 Přehled zastoupení prvků v huminových a fulvinových kyselinách [2].

Prvkové složení	huminové kyseliny (hm. %)	fulvinové kyseliny (hm. %)
uhlík	53,8–58,7	40,7–50,6
kyslík	32,8–38,3	39,7–49,8
vodík	3,3–6,2	3,8–7,0
dusík	0,8–4,3	0,9–3,3

Další charakteristika se zabývá zastoupením funkčních skupin (Tab. 2), které vypovídají nejen o struktuře, ale také kvalitě materiálu. Neboť čím vyšší zastoupení karboxylových či hydroxylových skupin, tím je zvyšována kyselost látek, proto jsou fulvinové kyseliny kyselejší než huminové kyseliny.

Tab. 2 Procentuální zastoupení funkčních skupin v huminových kyselinách [2].

Funkční skupina	zastoupení v procentech (hm. %)
karboxylové	4,4
alkoholová hydroxylová	3,3
fenolová hydroxylová	1,9
keto skupina	1,2
methoxy skupina	0,3

Celá řada vědeckých institucí se zabývá studiem molekulární struktury huminových kyselin, což se zároveň stalo jednou z nejobtížnějších oblastí studia v půdní chemii [2].

Znalost základní struktury huminových kyselin je velmi nutná pro pochopení role a funkce v půdě. Vzhledem k tomu, že se tato struktura skládá z velkého počtu funkčních skupin, které jsou vázány různými typy vazeb a jsou různě propojeny, přesné stanovení struktury je víceméně nemožné. Každá frakce je považována za „složeninu“ celé řady molekul různých velikostí, proto jsou dnes huminové kyseliny považovány za supramolekuly, tedy molekuly vyznačující se sdružováním molekul do multidisciplinárních komplexů za využití slabých vazebných interakcí (vodíkové můstky, van der Waalsovy síly, π-π interakce, hydrofobní síly atd.).

2.2.1 Využití huminových kyselin

Přirozený výskyt humusu v půdě a jeho dopad na její úrodnost je znám již od nepaměti, z čehož vyplývá, že vlastnosti huminových látek jsou lidmi využívány již celá staletí, ačkoli o jejich vlastnostech a původu nebyly známy žádné bližší informace. Jejich přítomnost v půdě má pozitivní vliv na rostliny a zároveň se také podílí na stabilizaci půdních agregátů apod.

V období na přelomu 18. a 19. století došlo k rozsáhlé těžbě hnědého uhlí a jeho využívání v mnohých průmyslových odvětvích a později i v energetice. Vzhledem k tomu, že nedílnou součástí hnědého uhlí jsou rovněž huminové kyseliny, můžeme tvrdit, že HK mimo jiné dosáhly hojného

využití v energetickém průmyslu. Avšak s přicházejícím zvýšením povědomí o ochraně životního prostředí byl proces spalování fosilních paliv omezen a zároveň byl nahrazen takovými zdroji energie, které jsou k životnímu prostředí mnohem šetrnější. Tyto zdroje nazýváme jako alternativní a patří sem sluneční, větrné nebo vodní elektrárny [21].

S ohledem na unikátní vlastnosti huminových látek, respektive huminových kyselin se vědecká společnost začala zabývat jejich dalšími možnými uplatněními, kde největšího aplikačního potenciálu našly huminové kyseliny v oblasti zemědělství, průmyslu, ochrany životního prostředí a farmacie.

Aplikace v zemědělství

Jak již bylo zmíněno výše, huminové kyseliny jsou součástí organické hmoty v půdě a podílí se na mnoha procesech, které ovlivňují nejen fyzikální a chemické vlastnosti půdy, ale také růst a kvalitu rostlin. Proto se staly jednou z důležitých aditivních přísad do celé řady rostlinných stimulátorů a dalších agrochemických produktů. Huminové kyseliny se také vyznačují sorpčními schopnostmi, které umožňují vázání živin a jejich postupné uvolňování do půdy [22] a [23]. HK jsou schopny na sebe vázat také molekuly vody, čehož je možné využít v oblastech trpících nedostatkem vláhy. Takto navázané molekuly vody mohou být opět kontinuálně desorbovány, což vede k udržení vláhy v půdě, její stabilizaci a k příznivějším podmínkám pro růst rostlin.

Aplikace v průmyslu

Rozsáhlého využití dosáhly huminové kyseliny také v oblasti průmyslu, a jak již bylo napsáno výše, HL byly využívány i v energetickém průmyslu jako zdroj energie. Huminové kyseliny jsou rozšířeny také ve stavebnictví, kde jsou používány jako hydrofobní plniva cementů. Tyto látky ovlivňují vlastnosti svatebních materiálů, zejména smáčivost, disperzitu a řízené vytvrzování. Obdobně jsou huminové kyseliny využívány také v keramice [23].

Dalšího využití našly HK v brusných a řezacích přístrojích, kde jsou tyto látky přidávány do chladicích kapalin za účelem změny viskozity a zároveň působí jako emulzifikátory. Tmavého zbarvení huminových látek se také využívá v papírenském, textilním a kožedělném průmyslu. Díky svým chelatačním a iontově výměnným schopnostem se tyto látky využívají jako náplně do chromatografických kolon [23].

Aplikace v ochraně životního prostředí

Huminové kyseliny se vyznačují sorpčními schopnostmi vůči běžným polutantům. Tyto látky jsou schopny na sebe vázat těžké kovy, detergenty, pesticidy, barviva a jiné škodlivé látky, které mohou mít negativní vliv na půdu, vodu a ovzduší. Huminovými kyselinami mohou být tyto škodlivé látky imobilizovány [23].

Aplikace ve farmacii

Aplikace huminových látek ve farmacii má značné omezení, a to kvůli jejich zbarvení, které není možné odstranit. Avšak určitých pozitivních vlastností bylo dosaženo při léčbě rakoviny dělohy, což bylo zkoumáno na laboratorních zvířatech [24] a [25]. Dále se tyto látky svým působením podobají účinkům heparinu, estrogenu a řada derivátů HK byla označena jako terapeutika [8]. Dalšího využití dosáhly huminové látky v oblasti kosmetiky, v bahenních lázních nebo léčebných zábalech.

2.3 Gelové systémy

Předložená disertační práce využívá gelových materiálů pro realizaci difúzních experimentů. Z tohoto důvodu byla obecným vlastnostem gelů věnována jedna z hlavních kapitol práce. Tato část je zaměřena na obecný popis gelových materiálů, jejich vznik, klasifikaci a jejich využití.

2.3.1 Úvod do problematiky gelových systémů

Gelem rozumíme disperzní systém tvořený ze dvou fází – disperzního prostředí (*dispergens*), který zaujímá většinu objemu disperzního systému a disperzního podílu (*dispergum*), což jsou částice koloidní velikosti (1–500 nm) rozptýlené v disperzním prostředí. Gelem jsou takové systémy, které mají charakter trojrozměrné makromolekulární sítě makroskopické velikosti a elastických vlastností. Tyto 3D struktury mohou vznikat z lineárního polymeru nebo jeho roztoku, pokud dojde k vytvoření dostatečného počtu spojů mezi makromolekulami [26]. Dle způsobu vzniku spojů (uzlů), rozdělujeme gely na chemicky síťované a fyzikálně síťované.

Chemicky síťované gely jsou nekonečné trojrozměrné síťové struktury, které vznikají v důsledku chemických reakcí, kdy dochází k vytvoření kovalentních vazeb mezi jednotlivými uzly. Tyto systémy mohou vznikat např. v důsledku vhodně uspořádané polymerace monomerů nebo z lineárních polymerů, které byly zesíťovány za přítomnosti vhodného síťovacího činidla [27].

V případě fyzikálně síťovaných gelů dochází ke vzniku 3D sítě spojováním polymerních řetězců pomocí slabých vazebných interakcí do spojů (uzlů). Tyto interakce mohou mít charakter van der Waalsových sil, polárních sil či vodíkových vazeb. Vznik těchto makromolekulárních struktur může být podmíněn asociací jednotlivých řetězců, ke které může dojít vlivem snížení afinity k rozpouštědlu některých skupin nebo sekvencí například snížením teploty, zvýšením koncentrace polymeru nebo zhoršením kvality rozpouštědla [27].

Dalším příkladem přípravy fyzikálně síťovaných gelů je ochlazení roztoku amorfního polymeru pod kritickou rozpouštěcí teplotu, čímž dojde k rozdělení jednotlivých prostředí. Pokud tento proces probíhá za vhodných podmínek, pak vzniklý gel může obsahovat submikroskopické oblasti s krystalickou strukturou, které nazýváme jako *krystalinita*. Přechod mezi amorfní a krystalickou strukturou má spojitý charakter [27].

2.3.2 Vznik gelových systémů

Gel je trojrozměrná síť, která vytváří souvislou strukturu disperzního podílu prostupující celým disperzním prostředím. Spojité je nejen disperzní prostředí, ale i disperzní podíl, který po spojení do sítě je schopen vykonávat pouze vibrační pohyb, ale nemůže se libovolně pohybovat mezi molekulami disperzního prostředí [28]. Síly, které poutají disperzní částice mezi molekulami disperzního prostředí, se nazývají *adhezní síly*.

Gely vznikají procesem, který se nazývá *gelace*. Jedná se o proces, při němž se spojují koloidní částice disperzního podílu v souvislou strukturu, která v závěru tvoří pevnou prostorovou síť. Gelace může být způsobena jedním z následujících procesů; změna fyzikálního stavu roztoku (změna pH, teploty apod.), čímž vznikají fyzikálně síťované gely; chemickou reakcí, která vede ke vzniku kovalentně síťovaných gelů. Gely mohou být připravovány také botnáním xerogelů, což ovšem platí pouze pro reverzibilní gely. Proces gelace je charakterizován tzv. *bodem gelace* [29], jedná se o krátký časový úsek, při němž je vytvořena nekonečná trojrozměrná síť, kde tato nová 3D síť má rozměry stejné s makroskopickou gelovou fází [27].

2.3.3 Klasifikace gelových systémů

Gelové systémy můžeme dělit na základě několika kritérií. Jedním z nich je, zdali tyto systémy obsahují či neobsahují rozpouštědlo, poté je rozlišujeme na *lyogely* a *xerogely*. Lyogelem označujeme gelové systémy, ve kterých je disperzním prostředím kapalné rozpouštědlo. Pokud je disperzním prostředím např. organické rozpouštědlo (fosfolipidy atd.), potom tyto gely nazýváme jako *organogely*. V případě, že je rozpouštědlem voda, nazýváme tyto systémy jako *hydrogely*.

Pokud rozpouštědlo není součástí systému, jedná se o tzv. *vysušené gely* neboli *xerogely*. Tyto struktury mají jednu velmi důležitou vlastnost, a tím je schopnost *botnat* čili opětovně absorbovat disperzní prostředí. Pokud je xerogel ponořen do rozpouštědla, potom dochází k jeho sorpci a vysušený gel se tak navrací do stavu lyogelu, respektive původního stavu gelu. Můžeme tedy tvrdit, že proces přechodu mezi xerogelem a lyogelem je *vratný* (*reverzibilní*), tudíž tyto typy gelů nazýváme jako *reverzibilní* [26].

Gelové systémy jsou dále děleny podle vazebné povahy na kovalentně a fyzikálně síťované. V případě kovalentně síťovaných gelů nedochází k přechodu lyogelu na roztok polymeru, proces přeměny je tak nevratný (*ireverzibilní*). Mluvíme-li o fyzikálně síťovaných gelech, kam patří i agarózové hydrogely, které vznikají z roztoků polymeru v důsledku změny teploty. Ohřátím roztoku nad teplotu tání dojde k rozpuštění biopolymeru, a poté při jeho ochlazení na teplotu 45 °C, respektive laboratorní teplotu, dojde k proplétání řetězců agarózy a stabilizace systému vodíkovými můstky za vzniku polotuhého hydrogelu. V opačném směru změny podmínek je hydrogel vrácen opět do původního stavu lyogelu. Takto se chovají gelové systémy, které nazýváme jako *termoreverzibilní* [27], kam řadíme i přírodní biopolymer agarózu (kap. 2.4).

Již v předchozích odstavcích bylo zmíněno, že gely dělíme podle jejich schopnosti navracet se z vysušené formy gelu (*xerogelu*) do původního stavu lyogelu, kde byly tyto gely popsány jako *reverzibilní*. Ovšem existují i takové typy xerogelů, které si zachovávají téměř stejný objem před i po ponoření do roztoku rozpouštědla. Tento typ gelu vzniká gelací lyofobních solů. Xerogely ponořené do rozpouštědla jsou sice schopny částečně do své struktury nasorbovat určité procento disperzního prostředí, ale nikdy nebudou mít podobu výchozího lyogelu, vzhledem k tomu, že mají pouze omezenou sorpční kapacitu (schopnost botnat). Tyto typy gelů se nazývají *nevratné (ireverzibilní)* [26].

2.3.4 Vlastnosti gelových struktur

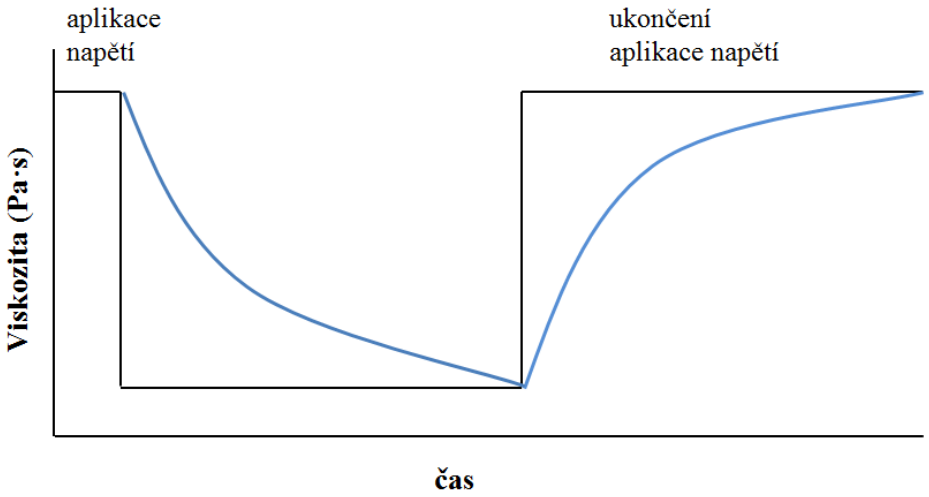
Mechanické vlastnosti

Gely mají unikátní mechanické vlastnosti, protože ačkoli nejsou typickými tuhými látkami, přesto mají mechanické vlastnosti charakteristické pro pevné látky. Gel je totiž schopný odolávat napětí až do hodnoty kritického napětí, pod kterou se chová jako *elastické tuhé těleso*. Po překročení této hodnoty dojde k nevratné deformaci vnitřní struktury gelu a systém se tak chová jako viskózní kapalina, začne téct. Hodnota kritického napětí závisí na koncentraci uzlů a na jejich pevnosti. Obecně lze říci, že gely se chovají jako *viskoelastické materiály*. Například v případě reverzibilních kovalentně vázaných gelů, které obsahují v jednotce objemu velký počet vazeb, jsou gely zpravidla *elastické* a platí, že čím více je vazeb mezi řetězci polymeru, tím menší je možnost změny tvaru makromolekuly a tím rigidnější je vzniklá prostorová síť [26].

Gely, které obsahují větší počet vazeb, jsou obvykle více elastické. Některé plastické a pseudoplastické gely se při smykovém namáhání (třepání, míchání, odstřeďování apod.) vyznačují *tixotropními vlastnosti* [23]. Z počátku jsou gely s tixotropními vlastnostmi charakteristické vysokou zdánlivou viskozitou, která se postupně s prodlužující se dobou působení smykovým namáháním snižuje. V případě, že by byl gel ponechán v klidu, začala by se znovu obnovovat původní struktura a zdánlivá viskozita gelu by se začala postupně zvyšovat a limitně se přibližovat hodnotě zdánlivé viskozity původního gelu [23].

Tixotropní vlastnosti vykazují gely s různou pevností uzlů ve své struktuře. Je-li na gely působeno dostatečně velkým mechanickým namáháním, začnou se nejprve porušovat nejméně pevné vazby, čímž se soustava začne rozpadat na velké celky. Ty se již nejsou schopny spojit do původní struktury a vytvořit tak gel s původními vlastnostmi.

Tixotropní vlastnosti mohou být pozorovány u některých reverzibilních i ireverzibilních gelů, které jsou tvořeny fyzikálními uzly. Pokud síly poutající původní disperzní částice do síťové struktury jsou velmi slabé, je možné gel více nebo méně prudkým protřepáním převést opět na sol. Mechanickými účinky totiž dojde k rozrušení slabých vazeb mezi částicemi. Pokud zůstane ztekucený sol stát v klidu, vazby se začnou pomalu obnovovat a zároveň začne docházet k nové gelaci, která povede k obnově viskozity do původní hodnoty [26]. Tixotropní vlastnosti 3D systémů jsou znázorněny na obrázku (Obr. 9). Existují však i případy, kdy mechanickým namáháním dochází ke vzniku gelu, tuto vlastnost nazýváme jako *reopexie* [26].



Obr. 9 Tixotropní vlastnosti gelových struktur [29].

Elektrická vodivost a difuzivita

Elektrická vodivost gelů, jejichž disperzní prostředí obsahuje disociované nízkomolekulární elektrolyty, zůstává téměř stejně vysoká jako v solu. Tento jev je způsoben pohybujícími se malými molekulami a ionty rozpuštěných látek v disperzním prostředí, které migrují v prostorách mezi sítěmi disperzního podílu téměř stejně rychle jako v odpovídajícím solu [23].

Pokud se budeme zabývat otázkou difuzivity nízkomolekulárních látek v gelu, tak je jen o něco málo menší než v původním solu, ze kterého byl gel připraven, a to i přesto, že se viskozita při gelaci prudce zvyšuje. Gelové systémy nemají díky své síťové struktuře difuzivitu ovlivněnou prouděním ani tepelnými konvencemi. Tato nerušená difúze látek v gelech vede ke vzniku tzv. *Liesegangových obrazců*. Tyto jevy vznikají v gelech, které obsahují nízkomolekulární látku, která v přítomnosti jiné difundující látky je schopna s ní tvořit nerozpustnou sraženinu. To vše probíhá v důsledku srážecích reakcí, které probíhají jen v určitých zónách, kde je překročen součin rozpustnosti a střídají se s místy, ve kterých se sraženina netvoří (koncentrace obou látek je pod součinem rozpustnosti) [23]. Liesegangovy obrazce jsou rovněž pozorovatelné v přírodě, například achátové kameny, které jsou zdobeny barevnými proužky, rostliny či skalní útvary v Utahu, Arizoně aj.

Synereze gelů

U reverzibilních i ireverzibilních gelů, které jsou čerstvě připraveny, dochází k samovolným procesům, protože tyto systémy se nenachází v termodynamické rovnováze. Při tomto procesu stárnutí roste počet styčných bodů, což vede ke smršťování síťovité struktury a kapalina obsažená v prostoru mezi spojenými řetězci začne být vytlačována ven z gelu. Tento jev nazýváme jako *synereze* a je podporována zvýšením teploty a přídavkem elektrolytů [26].

Anizotropie

Anizotropie gelů vychází z podmínek tvorby gelů, která je obvykle také dána jejich nerovnoměrnou deformací při tvorbě a nerovnoměrnou objemovou kontrakcí při vysoušení gelů. U těchto gelových systémů jsou vlastnosti v různých směrech různé a mezi tyto specifické charakteristiky řadíme roztažnost při botnání, smršťování při sušení a také optické či mechanické vlastnosti [26].

2.3.5 Využití gelových systémů

Gely patří mezi materiály, které se nachází všude kolem nás, typickým příkladem je lidské tělo, které je tvořeno více než z 80 hm. % vodou. Značná část se podílí na tvorbě hydrogelových prostředí uvnitř našeho těla, jako jsou oči, pojivové tkáně, mezibuněčný prostor atd.

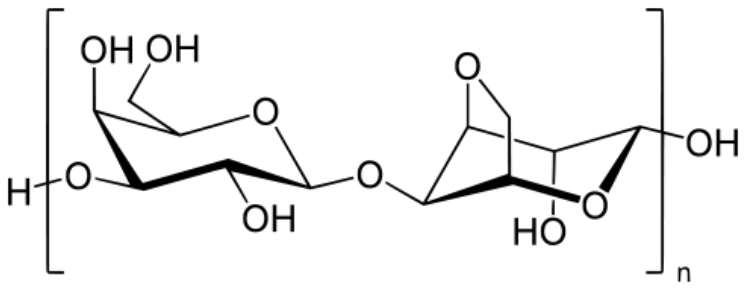
S gelovými systémy se můžeme setkat v řadě odvětví, jako je potravinářský průmysl, farmaceutický, environmentální aj. Gely nachází široké uplatnění, neboť jejich velkou výhodou je kontrolované uvolňování vody nebo jiných aktivních látek v nich obsažených. Této vlastnosti se již začíná využívat v oblasti zemědělství, neboť hydrogelová hnojiva umožňují postupné uvolňování živin do půdy, která tak nestrádá na důležité látky ovlivňující kvalitu a růst rostlin.

Kontrolované uvolňování látek z gelových materiálů je rovněž využíváno ve farmaceutických aplikacích, kde jsou tyto materiály využívány jako tzv. suprasorbenty neboli zdravotnické textilie. Tyto obvazové materiály opět umožňují uvolňování léčiva do poškozené tkáně kontinuálně a dlouhodobě, čímž dochází k rychlejšímu hojení či regeneraci rány. O dalších možných aplikacích hydrogelových systémů se můžeme dočíst v publikaci [30].

2.4 Agaróza

Difúzní experimenty byly realizovány prostřednictvím agarózových hydrogelů, které tvořily nosné matrice pro přijímací a zdrojový hydrogel (kap. 5.5). Z tohoto důvodu je agaróze, respektive agarózovým hydrogelům věnována jedna z hlavních kapitol předložené práce.

Agar je rosolovitá látka, která se získává z mořských řas rodu *Floridae* a *Gelidium,* byl objeven v 17. století v Japonsku. Tento materiál je tvořen z agarózy a agaropektinázy. Agaróza je přírodní polysacharid, který se vyznačuje vysokou schopností gelovat. Jedná se o lineární polysacharid složený z opakujících se jednotek agarobiósy, což je disacharid složený z D-galaktosových a 3,6-anhydro-L-galaktopyranosových podjednotek [30]. Její molekulová hmotnost se pohybuje okolo 120 kDa. Struktura agarózy je ilustrována na Obr. 10.



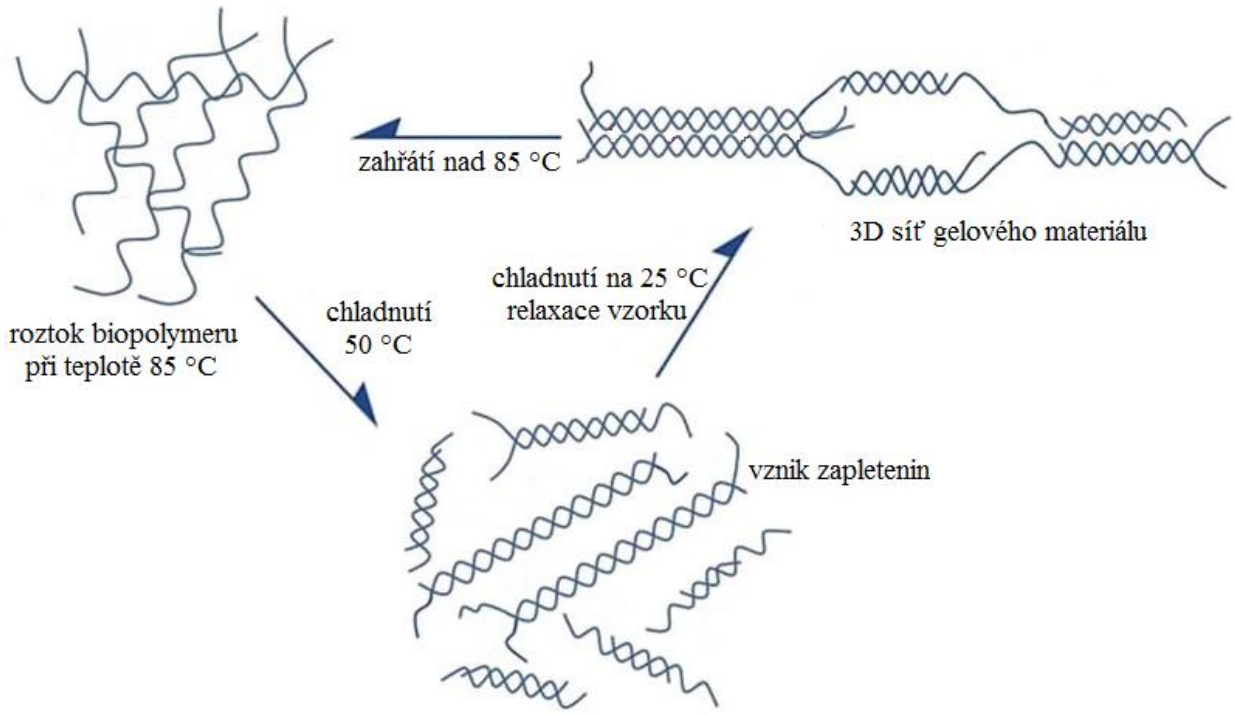
Obr. 10 Struktura lineárního polysacharidu agarózy [31].

Polymerní agarózová vlákna vytváří šroubovicovou strukturu, která je schopna agregovat ve větší celky, nadšroubovicové soustavy, které dosahují poloměru 20–30 nm. Vlákna jsou kvazi-rigidní a mají široký rozsah délky v závislosti na koncentraci agarózy.

Agaropektin je heterogenní směs menších molekul, které se vyskytují ve struktuře agarózy v menším množství. Tato látka má podobnou strukturu jako agaróza, ale na rozdíl od ní je méně

rozvětvená a sulfonovaná, navíc může obsahovat methylové skupiny a substituenty kyseliny pyrohroznové.

Agaróza je schopná podléhat termoreverzibilnímu sol-gel procesu, který je vyvolán změnou fyzikálního stavu disperzního systému – teplotou – za vzniku trojrozměrné sítě. Tento polysacharid je velmi dobře rozpustný v horké vodě, např. agaróza s nízkou teplotou tání se rozpouští při teplotě 85 °C. Agaróza je nerozpustná ve studené vodě a ve vodě, jejíž teplota je pod 45 °C. Tento polymerní materiál se využívá pro přípravu tzv. *termoreverzibilních gelů*. Při ochlazování roztoku agarózy (v rozsahu teplot 30–40 °C) [32] dochází k tuhnutí a vytvoření polotuhého gelového matriálu [33]. Pokud by došlo k ohřátí tohoto materiálu nad teplotu tání, došlo by ke zpětnému převodu gelu na sol. Tento proces termoreverzibilní přeměny je znázorněn na Obr. 10.



Obr. 11 Proces termoreverzibility agarózových hydrogelů [34].

Výše bylo uvedeno, že agarózové hydrogely se vyznačují termoreverzibilními vlastnostmi, tedy je-li agarózový hydrogel zahříván k bodu tání gelu (nad 85 °C), potom je získán sol biopolymeru. Při opětovném zchladnutí roztoku je získán opět polotuhý hydrogel. Tento jev je popsán tzv. *hysterezní křivkou*. Jedná se o křivku typickou pro hydrogely, neboť vyjadřuje proces přeměny roztoku na gel při dosažení bodu gelace materiálu a následně přeměny hydrogelu na sol biopolymeru při dosažení bodu tání. Ovšem křivky popisující jednotlivé děje nejsou shodné, neboť při zahřívání gelu a jeho opětovnému tuhnutí dochází k posunu této křivky vůči křivce popisující přechod ze solu na gel.

Agaróza v pevném stavu zaujímá jednoduchou nebo dvojitou helikální konformaci. Ke gelaci dochází v důsledku změny teploty, která vyvolá asociaci dvojitých helikálních struktur. Tato trojdimenzionální síť, respektive asociace dvoušroubovic je stabilizována vodíkovými můstky. Popisu vlastností agarózových hydrogelů je věnována kapitola 2.3.4. Gelací agarózy se zabývají rovněž v publikacích [35] a [36].

2.4.1 Využití agarózy

Agaróza, je lineární polysacharid, který nachází celou řadu uplatnění v oblasti biomedicíny, farmacie, kosmetologie, potravinářství aj. Z hlediska svých jedinečných vlastností, našel tento materiál uplatnění i v oblasti purifikace a separace biomolekul. Jedná se o typ média využívaného pro gelovou

permeační chromatografii (GPC) [34], [37] a [38], kde agarózový gel funguje jako separační médium. Další využití našel tento typ gelu také v gelové elektroforéze, kde funguje jako vhodný nosič elektricky nabitých částic. Tato metoda se například využívá při separaci jednotlivých nukleových kyselin ze struktury lidské DNA.

Agarózové hydrogely našly rozsáhlého uplatnění v oblasti potravinářství a biomedicíny. Používají se jako vhodná média pro růst mikroorganismů, kdy v oblasti potravinářského průmyslu jsou žádanější gely s nižší koncentrací, ale v biomedicíně jsou preferovány spíše gely s vyšší koncentrací, které se vyznačují rigidnější strukturou. Tyto materiály jsou schopny odolávat většímu mechanickému namáhání, a proto se používají v oblasti tkáňového inženýrství. Tyto materiály umožňují řízené uvolňování léčivých látek, a tím jsou schopny lépe a rychleji hojit poškozené tkáně. Více o této problematice pojednávají odborné publikace [39]–[41].

2.5 Superabsorbenty

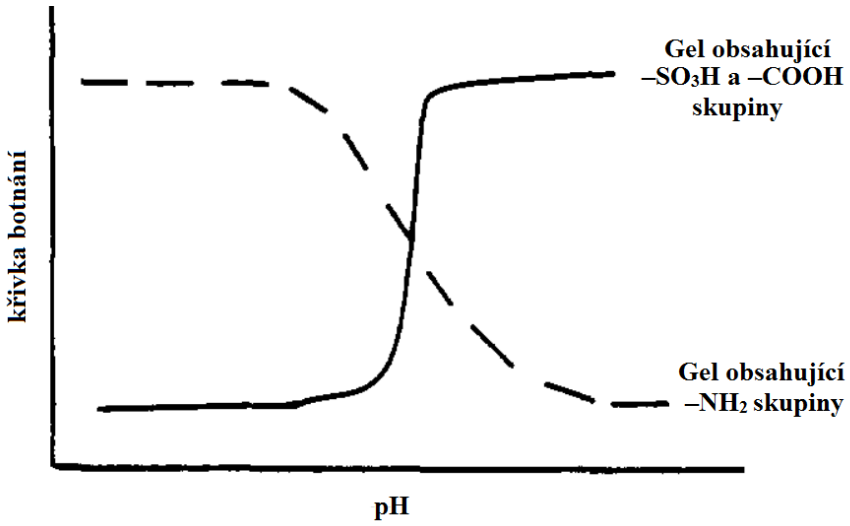
Superabsorbenty jsou typické gelové systémy, které byly využity jako nosné matrice aktivních látek při realizaci skleníkových experimentů (kap. 6.3). Tyto vysušené formy gelů obsahovaly ve své struktuře aktivní složky NPK a lignohumát draselný. Protože byly superabsorbenty stěžejním materiálem skleníkových experimentů, byla jim věnována jedna z kapitol disetační práce, pro pochopení jejich struktrury, funkce a vlastností.

2.5.1 Obecný úvod

Superabsorbenty jsou příkladem tzv. reversibilních xerogelů (respektive hydrogelů). Tento typ hydrogelů se rovněž nazývá jako super-absorpční polymery (angl. *Superabsorbent Polymers* – SAPs), které vznikají chemickým síťováním polymerních řetězců. Trojrozměrná síť prostupuje celým prostředím materiálu a je tvořená flexibilními polymerními řetězci, které jsou nosiči disociovaných funkčních skupin. Vysušené formy SAPs jsou schopny ve vodě či jiných vodných prostředích absorbovat až patnácti násobek své původní vysušené váhy. Takovým prostředím může být voda, elektrolyty, syntetická močovina nebo biologické kapaliny (krev, moč, pot) [42].

Schopnost SAPs absorbovat vodu je dána jejich povahou funkčních skupin, tento druh hydrogelů je charakterizován hydrofilními skupinami, jako jsou karboxylové kyseliny (–COOH), karboxylamidy (–CONH–, $–CONH_2$), hydroxyly (–OH), aminy ($–NH_2$), imidy (–NH–) a sulfonové skupiny ($–SO_3H$) [43]. Hydrogely mohou být dvojí povahy, neutrální nebo iontové. V neutrálních hydrogelech je hnací silou botnání, jehož vlastnosti jsou určeny dvěma příspěvky, příspěvkem termodynamického míchání systému polymer-voda a celkové volné energii systému. To zodpovídá za elastický charakter vzniklého polymeru, respektive hydrogelu [44].

U iontových hydrogelů je proces botnání způsoben rovněž dvěma příspěvky, jako u předešlých neutrálních hydrogelů. Navíc zde velkou roli hrají iontové interakce mezi nabitým polymer a volnými ionty [45]. Disociací karboxylových, aminových či sulfonových skupin dochází ke zvýšení hydrofilní povahy SAPs, díky čemuž jsou schopny více a lépe sorbovat vodu neboli botnat v prostředích o různém pH (Obr. 12). Příkladem polyelektrolytových hydrogelů jsou například proteiny, polypeptidy, poly(akrylová) kyselina, poly(styrén-sulfonát) a polyamidy [46].



Obr. 12 Závislost botnání superabsorbentu na pH a přítomných funkčních skupinách [46].

2.5.2 Příprava gelů s polyelektrolytovými sítěmi

Monomery

Iontové hydrogely jsou obvykle syntetizovány homopolymerními iontovými monomery nebo *co*-polymerními iontovými monomery s neutrálním monomerem. Běžnou technikou přípravy hydrogelů je síťovací metoda polymerů, která může být provedena dvojím způsobem. První způsob tzv. *co-polymerizační/síťovací metody* je založen na reakci *co*-monomeru s multifunkčními monomery coby síťovacími činidly za účasti inciátoru.

Druhá technika, *síťování lineárních polymerů*, je založená na vzniku hydrogelu prostřednictvím ozáření polymerního materiálu nebo reakcí mezi polymerem a další chemickou sloučeninou. Monomery užívané pro syntézu ionických polymerních sítí obsahují ionizovanou, hydrolyzovanou nebo substituovanou skupinu. Hydrogely mohou obsahovat slabě kyselé nebo slabě zásadité skupiny, jako jsou karboxylové kyseliny, primární nebo sekundární aminy, sulfonové kyseliny nebo kvartérní amonné soli [49].

Tab. 3 Přehled některých monomerů užívaných pro syntézu pH-senzitivních hydrogelů [46].

Monomery			
anionické	**kationické**	**amfolytické**	**neutrální**
akrylová kyselina polystyrensulfonová kys. itaconická kyselina krotonická kyselina	vinyl pyridin aminoethyl methakrylát 4-vinyl pyridin	*N*-vinyl glycin	2-hydroxyethyl methakrylát vinyl acetát akrylický monomer akrylamid

Některé monomery používané pro přípravu pH-sensitivních hydrogelů jsou uvedeny v Tab. 3. Nejběžněji užívanými síťovacími činidly jsou ethylen glykol dimethacrylát, *N,N'*-methylen *bis*-acrylamid a divinylbenzen.

Polymer syntetizovaný z monomerů

Hydrogely mohou vznikat i dalšími polymerizačními technikami, jako jsou polymerizace volným radikálem, řetězová polymerizace či kondenzační polymerizace. Většina biomedicínských hydrogelů bývá syntetizována právě polymerizací volným radikálem.

Polymerizační reakce probíhají v roztoku. Monofunkční a multifunkční monomery jsou spolu smíchány a polymerizace je iniciována přídavkem malého množství iniciátoru. Síťování je

formováno multifunkčními monomery tzv. síťovacími činidly, které jsou začleněny do dvou nebo více rostoucích řetězců. Polymerizační reakce může být iniciována volnými radikály generovanými teplem, zářením, radiací či redoxními prostředky. Další skupinou iniciátorů mohou být azo-sloučeniny, peroxidy nebo redoxní iniciátory. Iniciátorem polymerizační reakce může být použito i γ-záření. Hydrogely připravované chemickými reakcemi za přítomnosti iniciátoru vedou ke vzniku čistých SAPs, což je velkou výhodou oproti jiným postupům přípravy.

Co-polymerizační síťování v roztoku

V *co*-polymerizačních síťovacích reakcích jsou přítomny iontové a neutrální monomery, které jsou míchány s vhodným multifunkčním síťovacím činidlem. Pokud monomery a síťovací činidlo nejsou mísitelné, pak je nutné použít společné rozpouštědlo. Polymerizační reakce je iniciována teplem, UV zářením nebo redoxním iniciátorem. Výběrem vhodného rozpouštědla je možné připravit gely více způsoby, navíc umožňuje připravit gely rozmanitějších vlastností. V konečné fázi syntézy gelu, je nutné z něj odstranit nezreagovaná množství monomerů, oligomerů a jiných zbytků sloučenin [50], které mají negativní vliv na botnání gelů.

Při polymerizačním síťování hydrogelů je do systému přidána voda. Pokud je množství této vody větší než množství vody, které je hydrogel schopný po přípravě nasorbovat, potom uvnitř struktury hydrogelu došlo ke vzniku heterogenní polymerní sítě. Ta obsahuje domény vysoce síťovaných mikrogelů, které jsou vázány volnými řetězci polymerů. Tento fenomén je znám rovněž pod názvem *mikro-synereze* [51].

Množství vody během polymerní reakce hraje významnou roli rovněž při tvorbě dutých pórů ve struktuře gelu. Do těchto dutin je možné začlenit některé další látky, jako jsou například peptidy a využít tak tyto materiály pro nové systémy nosičů léčiv. Naopak, pokud je množství vody během polymerizace menší, než je obsah vody odpovídající rovnováze stupně botnání, potom vznikají gely bez pórů [46].

Suspenzní polymerace

Suspenzní nebo též emulzní polymerace je preferovaná metoda syntézy tzv. sférických hydrogelů. Jedná se o hydrogely kulového tvaru, které obsahují částice o průměru 1 μm až 1 mm, rovněž jsou tyto hydrogely označovány jako kulovité. Při suspenzní polymeraci je roztok monomeru mechanicky dispergován až do vzniku kapiček, které jsou nemísitelné s okolním prostředím a neobsahují žádný kapalný podíl. Tyto kapičky jsou v systému stabilizovány přídavkem stabilizátoru. Polymerace je iniciována teplem a volným radikálem. Při udržování konstantní teploty dochází ke vzniku kulovitého hydrogelu, který může být jednoduše získán z reakčního systému. Velikost částic a tvar závisí na suspenzním činidle, rychlosti míchání a nastavení otáček. Hydrofilní polymery, jako jsou síťované poly(vinyl alkoholy) nebo PHEMA (polyhydroxyethylmethacrylát), bývají produkovány ve formě perliček [52].

Síťování makro-monomerů/polymerů

Síťování polymerů za vzniku hydrogelu může být provedeno ozářením lineárního polymeru γ-zářením. Síťování je dáno reakcí mezi sousedními řetězci a volnými radikály. Polyakrylamidy, polyakryláty a poly(vinyl alkoholy) patří mezi hydrofilní polymery, které mohou být síťovány radiací. Jiné metody využívají bifunkční síťovací činidla, která mohou reagovat s funkčními skupinami polymerů [53].

Jiné síťovací struktury

Hydrogely můžou být připravovány rovněž jinými metodami například fyzikálním síťováním za vzniku zapletenin, komplexací s nábojem, hydrofobními nebo jinými specifickými interakcemi, které mohou vést ke vzniku hydrogelů. Polymer, jako například poly(vinyl alkohol), může tvořit krystaly, které přispívají k fyzikálnímu síťování a brání rozpuštění gelů.

Lineární polymery mohou vytvářet komplexy v důsledku působení vodíkových vazeb nebo iontových interakcí. Typickým příkladem komplexů vázaných vodíkovými vazbami je interakce mezi karboxylovými skupinami poly(akrylových kyselin) a poly(vinyl pyrrolidonu). Tímto způsobem vznikají fyzikálně síťované gely. Avšak fyzikální síť může být velmi snadno narušena například změnou pH nebo iontovou silou botnacího média [53].

Interpenetrační polymerní síť (angl. *Interpenetrating polymer network* – IPN) se vyrábí syntézou lineárního polymeru, botnáním monomerů a jeho polymerizací za vzniku sítě dvou různých polymerů. Hydrofilní, respektive hydrofobní charakter těchto IPN může být kontrolovaný správným výběrem obou polymerů a změnou jejich složení. Klasickým příkladem pH-senzitivních IPN je poly(akrylová kyselina) a polyethylen glykolový systém. IPNs mohou být rovněž připravovány syntézou dvou polymerů různými polymerizačními technikami, jako jsou kondenzace a volná radikálová polymerizace [54]. Právě radikálová polymerizace se stala vhodným prostředkem pro přípravu superabsorbentů využívaných pro oblast skleníkových experimentů (kap. 6.3).

2.5.3 Vlastnosti SAPs materiálů

Nejdůležitější studovanou vlastností superabsorbentů je jejich vodní absorpční kapacita (respektive schopnost botnat), neboť určuje, jak se daný materiál bude chovat ve vodných prostředích a jak „dobrým“ superabsorbentem z hlediska botnání budou [42]. Pro určení této vlastnosti je nutné znát hodnoty pH, iontové síly, teplotu a tlak [46]. Pro charakterizace SAPs se nejčastěji používají fyzikálně-chemické metody, jako jsou volumetrie, gravimetrie a spektroskopické metody [42]. Obecné principy stanovení vlastností SAPs jsou sepsány v následujících odstavcích, pozornost byla zejména věnována stupni nabotnání SAP a zadržování vody v SAP.

Stanovení stupně nabotanání SAP

Botnací poměr neboli stupeň nabotnání SAP se stanuje gravimetrickou metodou a to tak, že superabsorbenty se zváží po jejich vysušení do konstantní hmotnosti a následně i po jejich opětovném nabotnání v destilované vodě. Zpravidla platí, že botnání probíhá za laboratorní teploty nebo teploty odpovídající ~27 °C. Nabotnané vzorky se osuší papírovým ubrouskem, a poté zváží [55].

Botnací poměr (stupeň nabotnání) se stanovuje následující rovnicí (1):

$$\mathrm{AV}\ (\%) = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \cdot 100, \qquad (1)$$

kde AV je absorpce vody vypočtená v hm. %, W_2 je hmotnost nabotnaného hydrogelu a W_1 hmotnost vysušeného hydrogelu.

Zadržování vody v SAP

Zadržování vody v hydrogelech je studováno následujícími třemi postupy. První z nich je založen na zvážení plně nabotnaného hydrogelu, který je poté vysušen v sušárně při teplotě 70 °C. Hydrogel je vážen v určitých časových intervalech a zadržování vody se vypočítá dle rovnice (2) [55]:

$$\mathrm{RV}\ (\%) = \frac{W_{\mathrm{Vys},t}}{W_{\mathrm{bot}}} \cdot 100, \qquad (2)$$

kde RV je retence vody vypočítaná v hm. %, $W_{Vys,t}$ je hmotnost vysušeného hydrogelu po určitém čase *t* a W_{bot} je hmotnost nabotanného hydrogelu.

Druhý způsob stanovení zadržené vody v SAP je založen na následujícím experimentu. Do plastového kelímku je naváženo 100 g písku, který je obohacen o 0,1 g SAPs (experiment A). Dále do identického (stejné rozměry, materiál, váha) plastového kelímku je odváženo rovněž 100 g písku, ale již bez přídavku SAPs (experiment B). Do obou kelímků je přidáno 300 ml vody a vzorky jsou uschovány v inkubátoru za podmínek 30±2 °C po dobu 15 dní.

Po tuto dobu jsou prováděny každodenní odečty hmotností u obou studovaných vzorků. Rozdíly hmotností mezi vzorky s obsahem a bez obsahu SAPs jsou vzájemně porovnány. Z rozdílů obou kelímků je možné stanovit schopnost zadržování vody. Retence vody byla vypočtena na základě vztahu (3) [55]:

$$\mathrm{RV}\ (\%) = \frac{W_{s,t}}{W_0}, \tag{3}$$

kde WR je retence vody v hm. %, $w_{s,t}$ je hmotnost směsi v čase a w_0 je počáteční hmotnost směsi.

Poslední experiment je založen na stanovení množství zadržené vody v důsledku použitého SAP materiálu a zadržení vody v závislosti na hmotnosti použitého SAP materiálu. Experiment má podobný základ jako výše popsaný experiment druhého typu. Připraví se 4 vzorky vysušených půd ve směsi se superabsorbentem. Poměry SAPs a půdy jsou následující: 0 g SAP na 100 g půdy; 0,1 g SAP na 100 g půdy; 0,2 g SAP na 100 g půdy a 0,4 g SAP na 100 g půdy. Vzorky se uschovají v kondicionační komoře při teplotě 30 ± 2 °C po dobu 15 dní.

Vzorky se každodenně váží a na základě rovnice (3) se vyhodnotí retence vody. Výsledky se mezi sebou vzájemně porovnají, čímž se zjistí trend RV, tedy závislost retenčních vlastností na množství použitého SAP substrátu [55].

Faktory ovlivňující botnání hydrogelů

Vzhledem k tomu, že se velká část dizertační práce zabývá aplikacemi superabsorbentů v praxi, je velmi důležité znát jejich vlastnosti a faktory ovlivňující proces botnání, který by tak mohl mít negativní dopad na jejich využití. Zároveň tyto poznatky mohou být využity v budoucnu pro jednoduché charakterizace SAPs a hledání tak souvislostí mezi těmito výsledky a výsledky ze skleníkových experimentů.

Faktorem ovlivňujícím botnání iontových sítí v gelu může být zapříčiněn ionizací těchto sítí. Proto stupeň ionizace, ionizační rovnováha, koncentrace ionizačních skupin uvnitř polymerní sítě, pH a iontová síla botnacího média, valence a složení botnacího média ovlivňuje dynamiku a rovnováhu botnácího charakteru. Jiné vlastnosti polymerních materiálů, jako jsou stupeň zesítění, hydrofilní/hydrofobní rovnováha, může rovněž ovlivňovat botnací charakter materiálu [46].

2.5.4 Aplikace a uplatnění SAPs materiálů

Superabsorbenty našly velké uplatnění v oblasti aplikací spotřební chemie díky svým unikátním sorpčním vlastnostem. Hojně se začaly používat v odvětví kojeneckých a dětských potřeb, neboť se začaly využívat pro výrobu dětských plen, dámských hygienických potřeb či inkontinenčních produktů. SAPs našly rozsáhlé použití v oblastech zemědělství, zahradnictví, sanitárního zboží nebo medicíny [42].

Tato jedinečná vlastnost superabsorbentů vedla k myšlence jejich využití v dalších oblastech běžného života například do toaletních papírů, chirurgických houbiček a tampónů, misek pro uchovávání mastných čerstvých výrobků, jednoúčelových podložek pro venkovní zábavu či pro

koupelny nebo pro bandáže a obinadla ve zdravotnictví. Dalším možným uplatněním mohou být produkty řízeného uvolňování vlhkosti, respektive začleněné účinné látky, a tudíž jejich využitelnost pro farmaceutický nebo zemědělský průmysl [42].

Jeden z příkladů aplikace SAPs v běžném životě jsou iontové hydrogely. Ty našly své uplatnění pro tzv. nosičové systémy s kontrolovaným botnáním, které jsou využívané pro řízené uvolňování léčiv. K uvolnění léčiva dochází v důsledku změny podmínek například změnou pH. Pokud se tento typ hydrogelu dostane do trávicího traktu, kde je výrazně nižší pH než v jiné části těla (pH = 1,8 až 4,0), hydrogel uvolní aktivní látku (léčivo) [47], [48]. Tohoto principu je například využíváno u hydrogelů citlivých na glukózu, při nichž dochází ke kontrolovanému uvolňování insulinu do těla.

Rovněž díky elastické povaze a schopnosti pohlcovat vlhkost našly hydrogelové materiály uplatnění v oblastech kosmetiky, stavebního průmyslu nebo elektrotechniky. Aplikační využití našly i v oblastech fyzioterapie a regenerace, kde slouží jako chladivé nebo naopak hřejivé polštářky při námaze a uvolnění svalů.

SAPs jsou využívány nejen na poli produktů využitelných pro člověka, jako jsou bio-sorbenty, bio-materiály, farmaceutické produkty, lékové formy s cíleným uvolňováním, ale rovněž na poli zemědělství, lesnictví, stavebním průmyslu, komunikačních technologií a aplikacích pro životní prostředí.

2.6 Stavba rostlin

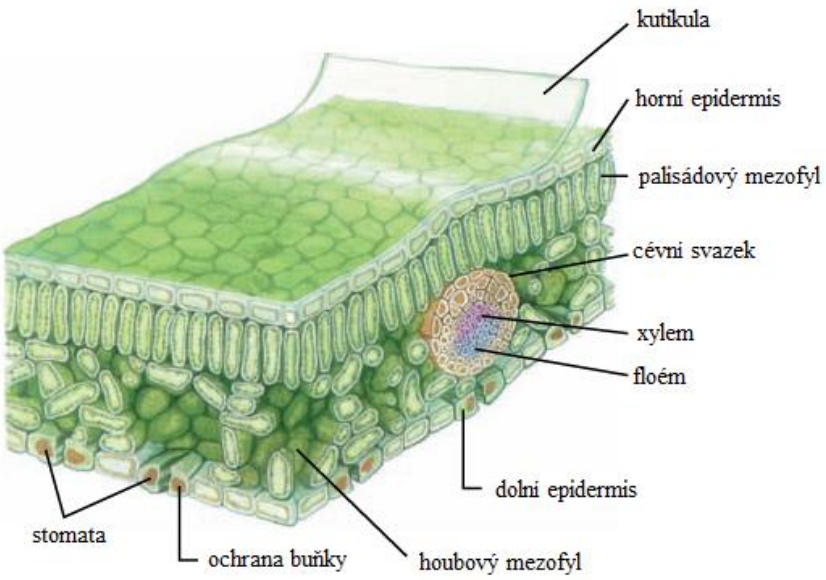
Difúzní experimenty simulující foliární hnojení byly realizovány na rostlinných kutikulách, což jsou tenké membrány na povrchu listů. Aby byla pochopena jejich role a důležitost, byla zpracována krátká kapitola zabývající se stavbou rostliny a dále obsáhlejší kapitola zaměřená pouze na stavbu rostlinných kutikul a jejich transportní procesy (kap. 2.7). Správná funkce rostlin je podmíněna její strukturou, která se skládá ze tří základních částí: kořene, stonku a listů [42].

Kořen je podzemní část rostliny, který rozlišujeme dle jejich typu na hlavní s postranními kořínky (dvouděložné rostliny) nebo na svazčité (jednoděložné rostliny). Kořen je tvořen třemi částmi; pokožkou s kořenovými vlásky, dužinou a cévními svazky neboli žilkami. V neposlední řadě kořeny dělíme dle jejich funkce na upevňovací (uchycení k půdě), čerpací (čerpání živin), ukládací (ukládání zásobních látek) a rozmnožovací. Stonek je nadzemní část rostliny, z něhož vyrůstají listy, pupeny a květy. Stonky dělíme dle typu na bylinné a dřevnaté. List je nadzemní část rostliny vyrůstající ze stonku. Z hlediska vnější stavby je list tvořen čepelí a řapíkem. Jeho vnitřní struktura je však o mnoho složitější, neboť je tvořena velkým množstvím buněk, avšak s ohledem na téma dizertační práce zaměřené na rostlinné kutikuly, je dostačující, že list je tvořen svrchní pokožkou (adaxiální kutikula), dužninou s cévními svazky a spodní pokožkou (abaxiální kutikula), která je zpravidla nositelem stomat neboli průduchů [57].

2.6.1 Struktura listu

Listy se dělí dle anatomické stavby na bifaciální, monofaciální a unifaciální. Bifaciální (dorziventrální) listy jsou různostranné, ploché s rozdílnou stavbou na svrchní a spodní straně. Tyto listy jsou jedny z nejběžnějších. Monofaciální (izolaterální) listy jsou stejnostranné, ploché a jejich stavba je na obou stranách stejná např. u kosatce. Unifaciální (monolaterální) listy jsou jednostranné, které se vyznačují válcovitým nebo rourovitým tvarem jako např. u cibule [57].

Prostor, který je vyplněn mezi svrchní, spodní pokožkou a cévními svazky, se nazývá mezofyl. Toto parenchymatické pletivo se u bifaciálních listů rozlišuje na palisádový parenchym, který těsně přiléhá ke svrchní pokožce, a houbový parenchym, který přiléhá naopak ke spodní pokožce [57]. Struktura listu je zachycena na obrázku níže (Obr. 13).



Obr. 13 Průřez listem a zachycení jednotlivých jeho částí [57].

Palisádový parenchym bývá zpravidla tvořen jednou nebo více vrstvami protáhlých buněk, které jsou orientovány k hornímu epidermu. Tyto buněčné útvary nazýváme jako palisádové buňky, které neobsahují interceluláry, ale obsahují velké množství chloroplastů podílejících se na fotosyntéze.

Houbový parenchym je z pravidla tvořen buňkami různých tvarů obsahující velké interceluláry, které jsou propojeny s průduchovými dutinami (stomaty). Houbový parenchym neobsahuje chloroplasty, proto je jeho hlavní funkcí tzv. transpirace. Z těchto důvodů je spodní část listu vždy světlejší než svrchní [59].

Cévní svazky, které se podílí na tvorbě žilnatiny (nervatur), jsou převážně kolaterální (uzavřené) případně bikolaterální (otevřené). Tyto svazky se v listech potupně rozvětvují a zjednodušují, dále se kolem nich nacházejí buď parenchymatické, nebo sklerenchymatické pochvy, které se podílejí na vyztužení čepele. Z listu jsou cévní svazky uspořádány do polokruhu a tvoří tzv. řapík [57].

2.7 Kutikula

2.7.1 Obecné poznatky o rostlinné kutikule

Na primární stavbě těla vyšších rostlin se podílejí následující čtyři typy pletiv: meristématická, základní, krycí a vodivá. Všechny tyto pletiva se skládají z charakteristických typů buněk (původ, tvar aj.) a plní více než jednu funkci [60]. Rostlinná pletiva jsou velmi složité komplexní systémy, které se dělí dle specifických vlastností. Pro realizaci disertační práce jsou používány svrchní membrány listu, proto je pozornost věnována zejména krycím pletivům. Tato pletiva jsou složené systémy jednoduchých pletiv, které jsou organizovány do spolupracujících celků, někdy jsou označovány jako tzv. kutikuly.

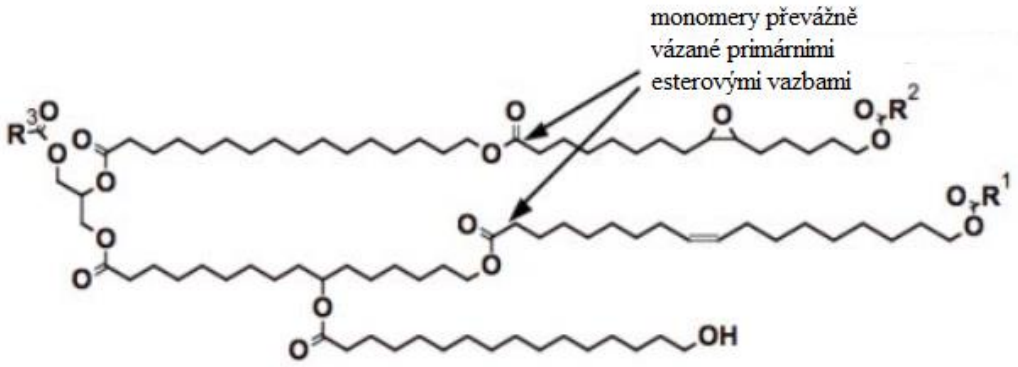
Pro život všech vyšších rostlin je nezbytný transport látek extracelulárními lipofilními membránami, které tvoří rozhraní mezi vnějším okolím a vnitřním prostředím rostliny, jsou zodpovědné za řízený průnik vody, rozpuštěných látek a plynů. Kutikuly bohaté na lipidy mají ovšem i další důležitou roli, a to zajistit ochranu a přežití rostliny. Jejich cílem je chránit rostliny před biotickými (hmyz [61], škůdci, houby, plísně [62] aj.), abiotickými (déšť, mráz, UV záření aj.) vlivy a před dehydratací [63] a [64]. Dále se podílí na ochraně proti UV záření [65] a změnám tlaku zodpovědných za vypařování vody [66]. Na základě podrobnějšího výzkumu bylo dále zjištěno, že kutikula je nezbytný orgán

rostlin potřebný pro další důležité procesy v jejich těle, jako je například průběh tzv. organogeneze, kde napomáhá k udržení oddělení orgánů [60].

2.7.2 Struktura rostlinné kutikuly

Rostlinná kutikula je důležitým orgánem nadzemních částí rostliny, zároveň tvoř i nejsvrchnější část kořenového systému. Obecně můžeme tvrdit, že všechny nadzemní rostliny jsou kryté tenkou kutikulární stěnou neboli membránou (angl. *Cuticular membrane* – CM) [64], [67] a [68]. Kutikula je přítomná na vnějším povrchu epidermálních buněčných stěn listů, primárních stonků, květů a plodů [69], [70]. Kutikula je extracelulární lipofilní biopolymer tvořený z kutinu, buněčné stěny tvořené polysacharidy [71], [72] a kutikulárních lipidů často nazývaných jako kutikulární vosky [73]. Obecně můžeme tvrdit, že kutikula je materiál tvořený z lipofilních (apolárních) složek, mezi něž patří vosky a kutin, a z hydrofilních (polárních) složek, mezi něž řadíme polysacharidy [61]. V některých vědeckých publikacích se můžeme setkat rovněž s pojmem suberin, který je rovněž součástí lipofilních biopolymerů [69], [70], [74]–[76]. Struktura vrstvy kutikuly se na první pohled jeví jako amorfní, ale pod elektronovým mikroskopem byly pozorovány lamelární ultrastruktury [67],[69], protože rostlinná kutikula pokrývá rovněž stomata, antiklinální buněčné stěny a trichomy.

Kutin je polyester oxidovaných mastných kyselin a glycerolů, je tvořený dlouhými uhlíkatými řetězci zpravidla o délce C_{16} a C_{18}. Na dlouhé řetězce polymeru jsou navázány ω-hydroxy a ω-hydroxy-epoxy mastné kyseliny, které jsou derivovány z C_{16} nasycených a C_{18} nenasycených mastných kyselin. V menším množství se zde může objevit i hydroxyskořicová kyselina [70]. Monomery kutinu jsou vzájemně esterifikovány primárními hydroxylovými skupinami tvořící lineární polyester (Obr. 14). Kutin hraje významnou roli v řízení obsahu vody v rostlině, která může přicházet jinou cestou než skrze průduchy například přes kořenový systém rostlin. Rovněž zodpovídá za výměny plynů a interakce s hostujícími patogeny [74], [77].



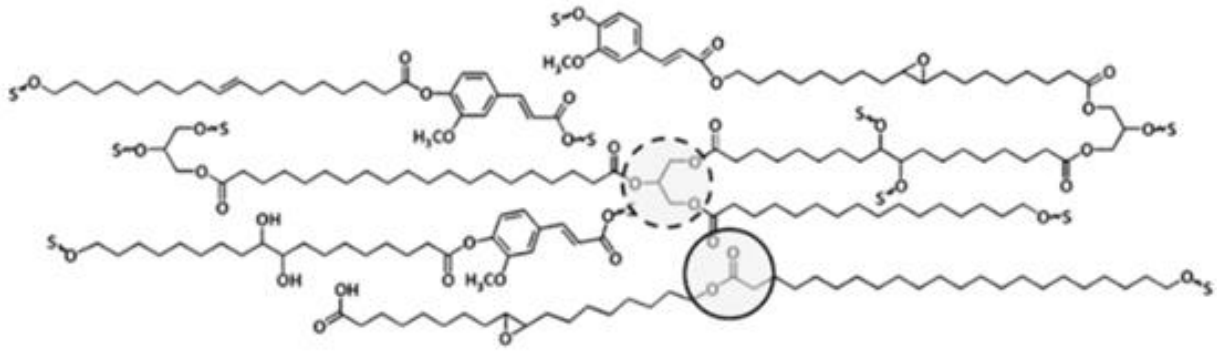
Obr. 14 Hypotetický návrh monomerů, které by mohly být objeveny v kutinu bohatého na ω-hydroxy mastné kyseliny. Přítomnost primárních a sekundárních esterových vazeb, avšak primární dominují. R znázorňuje alifatický polyester [70].

Kutin je hlavní složkou vícevrstvé struktury na povrchu rostlin, tedy kutikuly. Horní část pokožky je potažena tenkou vrstvou vosku, další vrstva je tvořená z kutinu, který se váže na vosky a tvoří tzv. vlastní pokožku. Spodní část bariéry je potažená kutinem spolu s vosky, které navíc obsahují směs pektinu, celulózy a jiných sacharidů. Tuto část pokožky nazýváme jako kutikulární vrstva [71].

Suberin je rovněž polyester velmi podobný kutinu, avšak typické jsou pro něj dikarboxylové skupiny navázané na jeho dlouhé uhlíkaté řetězce. Rostliny syntetizují suberin z důvodu vytvoření hydrofobní bariéry, která bude nepropustná pro vodu a vodou rozpustné látky, rovněž zabraňuje difúzi látek skrze buněčnou stěnu nebo poskytuje ochranu při stresových podmínkách. Suberin je uchováván ve vnitřní i vnější tkáni. Příkladem vnější tkáně je uschování v peridemových stěnách podzemních

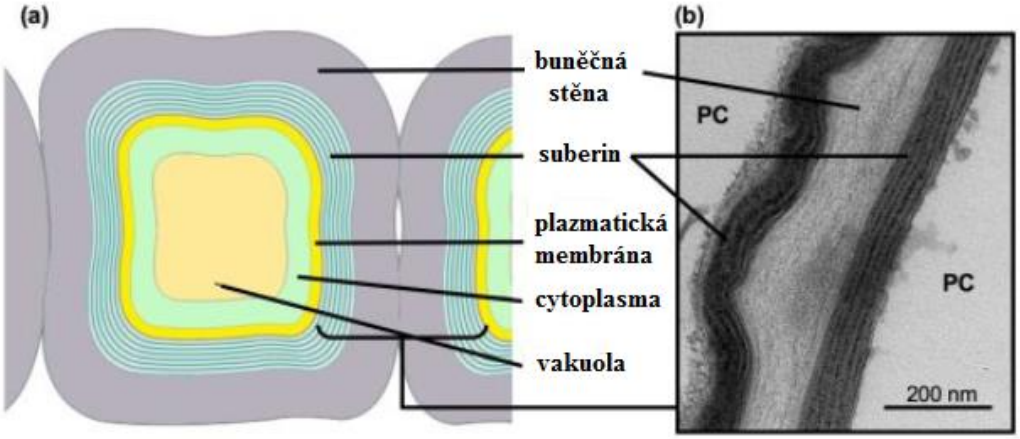
orgánů (hlízy, kořeny), v epidermu kořenů rostlin nebo ve vláknech bavlny. Vnitřní uschování je typické pro endodermis kořenů rostlin nebo ve svazcích jednoděložných rostlin [74].

Suberin je heteropolymer obsahující alifatické polyestery asociované s polyaromatickými sloučeninami a zabudovanými vosky. U monomerů suberinu byly rozpoznány C_{16}-C_{18} ω-hydroxymastné kyseliny a C_{16}-C_{26} α,ω-dicarboxylové kyseliny [74]–[78] a později dokonce byly diagnostikovány nesubstituované velmi dlouhé řetězce mastných kyselin (angl. *very-long-chain fatty acids* – VLCFAs; > C_{20}), alkoholy, glycerol a ferulát (Obr. 15) [79].



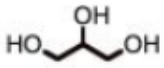
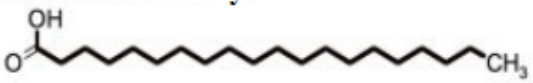
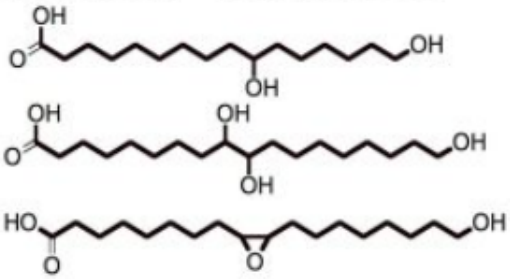
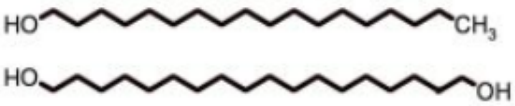
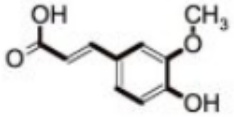
Obr. 15 Schématické znázornění suberinu. Znázorňuje lineární alifatické esterové vazby (plný kruh) a acylglycerol esterové vazby (čárkovaný kruh) [80].

Nejvýznamnějším rozdílem mezi suberinem a kutinem je v jejich výskytu. Zatímco kutin je složka nacházející se zejména na vnější straně primární buněčné stěny, suberin se nachází především na její vnitřní straně obvykle v blízkosti plazmatické membrány (Obr. 16) [81].



Obr. 16 Schéma suberizovaných peridemových buněk, typická je pro ně lamelární struktura umístěná mimo buněčnou stěnu. (a) Schéma buněk, (b) transmisní elektronová mikroskopie suberizovaných kořenových buněk, PC je peridermová buňka (angl. *Periderm cell*) [70].

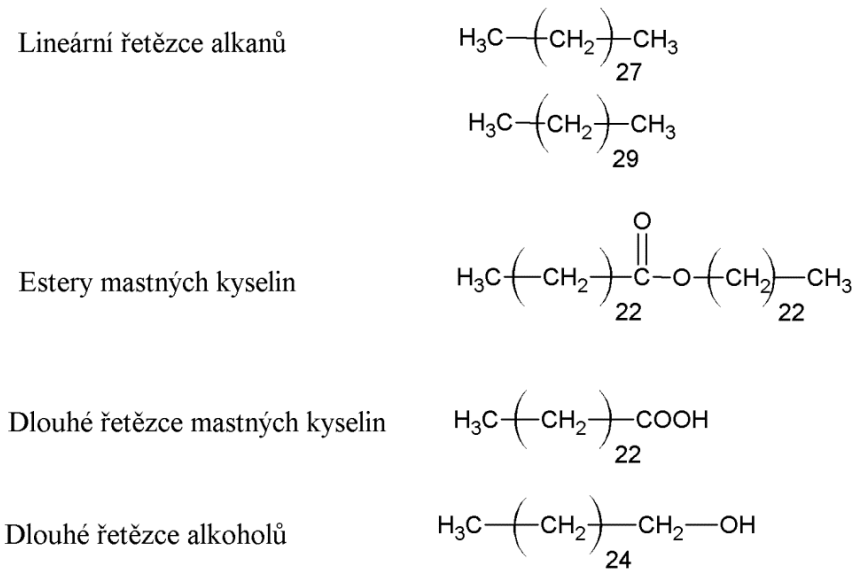
Ze zmíněných skutečností je zřejmé, že kutin a suberin jsou dva velmi podobné polymery vyskytující se v rostlinné kutikule. Pro jejich rozlišení byla vypracována tabulka (Obr. 17), která shrnuje všechny v nich obsažené složky a jejich množství výskytu.

Monomer	Kutin	Suberin
Glycerol 	Značné množství	Značné množství
Nesubstituovaná kyselina 	Menší výskyt (C_{16} – C_{18})	Menší výskyt (C_{16} – C_{26})
α,ω-dikarboxylová kyselina (C_{16} – C_{26})	Menší výskyt	Běžný výskyt
ω-hydroxykyselina	Větší výskyt (C_{16} – C_{18})	Běžný výskyt (C_{16} – C_{26})
Substituovaná ω-hydroxykyselina (C_{16} – C_{18}) 	Větší výskyt	Menší výskyt
Alkoholy vyšších mastných kyselin 	Vzácně (C_{16} – C_{18})	Běžný výskyt (C_{16} – C_{22})
Ferulová kyselina 	Menší výskyt	Větší výskyt

Obr. 17 Přehled složek vyskytujících se v kutinu a suberinu [70].

Kutan je další strukturní polymer, který zůstává ve formě nedepolymerizované frakce po hydrolýze esterové vazby kutinu. Kutan je tvořený z kutinových monomerů převážně vázaných étery a uhlíkovými (C–C) vazbami [82], [83].

Další složkou tvořící stavbu kutikuly jsou směsi chloroform-rozpustných kutikulárních a intracelulárních lipidů, které jsou souhrnně označovány jako vosky. Rozlišujeme tzv. *kutikulární vosky*, které obsahují dlouhé řetězce alkanů (C_{16} –C_{36}) a substituovaných derivátů jako jsou mastné kyseliny, primární a sekundární alkoholy, aldehydy a ketony [84]. Dále existují *suberin-asociované vosky*, které na rozdíl od kutikulárních vosků obsahují alkany, primární alkoholy, mastné kyseliny, alkyl feruláty a monoacylglyceroly. Aromatická síť suberinu je tvořená z C–C polymeru a éterem vázané hydroxyskořicové kyseliny, *N*-feruloyltyraminu a monolignolu [70]. Grafické znázornění chemické struktury vosků je uvedeno na Obr. 18.



Obr. 18 Přehled složek podílející se na vzniku kutikulárních vosků.

Vosky jsou utvářeny přímo na buňkách epidermu a tvoří vnější vrstvu kutikuly. Vosky mohou často krystalizovat ve složité mikrostruktury, které napomáhají ke zvýšení drsnosti a hydrofobních vlastností povrchu rostlin. Drsný povrch rostlin zabraňuje shlukování kapek vody, odváděné kapky z povrchu listu napomáhají k odstraňování nečistot, a tak čištění rostlin [71].

Rostlinná kutikula je, z hlediska své struktury mnohovrstevnou strukturou, která je tvořená kutikulární vrstvou, která je spojená s buněčnou stěnou. Tato vrstva obsahuje polymery, vosky a polysacharidy. Další částí je vlastní kutikula obsahující kutin, intracelulární a epikutikulární vosky. Tloušťka těchto vrstev a jejich složení závisí na druhu, anatomické stavbě, výskytu a vývojové fázi. Šířka rostlinných kutikul může dosahovat 0,1–14 μm a může obsahovat více než 20–600 μg kutinu na 1 cm^2 [71].

Stavba rostlinné kutikuly je popsána jako velmi složitá komplexní struktura, která má umožňovat transport látek mezi vnějším okolím a vnitřním prostředím listu a zároveň má chránit povrch rostliny. O bariéře takovýchto vlastností je možné říci, že se jedná o téměř ideálně izolovaný systém znemožňující průchod nejrůznějším patogenům a nežádoucím látkám, avšak je zodpovědná za regulaci přírůstku a úbytku vody, což je zprostředkováno stomaty a částečně i kutikulou nacházející se mimo tato otevřená místa.

2.7.3 Transport agrochemikálií (hydrofilních roztoků) listovým povrchem

Penetrace foliárně aplikovaných roztoků procesem difúze

Agrochemické přípravky jako rostlinné ochranné produkty nebo minerální výživové přípravky, jsou často aplikovány na rostlinu foliárně, aby použité složky byly co nejrychleji cíleny na rostlinné orgány [85]. Foliárně aplikované sloučeniny jsou penetrovány skrze listový povrch procesem difúze [86], a proto tento proces může být popsán na základě principů Fickových zákonů. Hlavním parametrem určujícím rychlost penetrace rozpuštěné látky skrze listový povrch jsou: koncentrační gradient skrz rostlinný povrch a permeabilita kutikulou stanovující výslednou rychlost penetrace [85].

Aktuální koncentrační gradient foliární penetrace je zpočátku dynamický kvůli rovnováze foliárně aplikovaných vodných roztoků přípravků a prostředí. První fáze, ihned po aplikaci agrochemikálií na rostliny, je obvykle charakterizována dynamikou vypařováním vody a výsledným nárůstem koncentrace roztoku na povrchu listu [61].

Foliárně aplikované látky jsou penetrovány povrchem listů skrze rostlinné kutikuly [87] a [88]. Tento proces penetrace je ovlivněn mnoha faktory například fyzikálně-chemickými vlastnostmi roztoku a charakterem povrchu listů. Látky penetrující skrze rostlinné kutikuly mohou být lipofilního charakteru, jako jsou například pesticidy, herbicidy nebo minerální hnojiva.

Mechanismem foliárního příjmu živin do listů se zabýval *Seshadri Kannan* [89], který souhrně popisuje dosavadní výsledky té doby zabývající se transportními procesy do listů. V dnešní době jsou již známy transportní procesy odehrávající se v kutikule, respektive ve stomatech (viz níže), avšak musíme si uvědomit, že tyto principy nebyly známé po dlouhá léta. Například mechanismy iontové absorpce do listů a schopnost lokalizovat transport iontů v rámci rostliny byly objasněny až v 80. letech 20. století. Doposud nebyly stále objasněny některé další procesy, jako je například translokace prvků penetrujících z jednoho listu do listu druhého v různých fázích rostlinného růstu.

Studium penetrace rozpuštěných látek přes kutikuly upozorňují na to, že tento proces je pouze pasivní a není zapotřebí dodání vnější energie. Jediné, čím je možné ovlivnit transport látek, je použít nějaké aditivum, které se bude rychleji absorbovat do pokožky listů, tím může být například močovina. Právě močovina podporuje zvýšení výskytu iontů v kutikulárních membránách [89].

Jednoduchými procesy prostupu vody do listů se zabýval *Haas* a *Schönherr* [90]. Ti uvádějí, že prostup vody u různých druhů rostlinných kutikul je určen několika parametry. Jedním z nich jsou rozpustné lipidy na povrchu kutikul a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, což souvisí i se schopností propouštět vodu. O tom všem ještě pojednávají následující podkapitoly níže.

Penetraci agrochemických přípravků skrze listový povrch je možné popsat pomocí dvou cest, které se ověřily [85] jako nejpravděpodobnější, jednou z nich je tzv. kutikulární transportní cesta a druhým stomatální transportní cesta neboli transport přes stomata. U obou typů cest hraje důležitou roli jejich povrch zejména absorbovaná vlhkost.

Proces ovlivňování koncentrace rozpuštěné látky na povrchu listu

Koncentrace aplikovaného roztoku na listový povrch závisí na relativní vlhkosti vnějšího vzduchu (angl. *relative humidity* – RH) a na typu rozpuštěné látky. Rozpuštěná látka aplikovaná na povrch listu může být buď kompletně vysušena, anebo zůstává v podobě roztoku. Pro každý vodný roztok je vždy definována prahová RH, díky níž zůstává látka v rozpuštěné formě. Tuto prahovou relativní vlhkost nazýváme jako rozpustnou relativní hmotnost (angl. *deliquescence relative humidity* – DRH), která má významný vliv na foliární absorpci látek [61].

Pokud bude platit, že DRH nabývá stejných hodnot jako RH, potom koncentrace rozpuštěné látky dosahuje maxima. Pokud ale okolní RH bude svou hodnotou převyšovat nad DRH, potom koncentrace rozpuštěné látky bude klesat a blížit se k nulové hodnotě. Nuly dosáhne v bodě, jakmile bude atmosféra nasycená vodou a dojde ke kompletnímu vysušení aplikovaného roztoku. Foliární příjem je způsoben koncentračním gradient roztoku na povrchu listu a vodným prostředím uvnitř listu. Relativní vlhkost má významný vliv na rychlost penetrace foliárně aplikovaných přípravků [61].

Kutikulární transportní cesta a vliv vlhkosti na penetraci

Penetrace lipofilních molekul skrze kutikulu byla matematicky popsána pomocí difúze z roztoku, úpravami matematických vzorců a odvození se zabývali autoři *Riedererem* a *Fridmannem* [91]. Tento matematický aparát předvídá rychlost penetrace dané molekuly z její rozpustnosti a z jejího pohybu v určeném médiu [92].

Penetrace lipofilních látek skrze kutikuly mohla být popsána výše zmíněným modelem, avšak rozpustnost iontů v kutikule byla příliš nízká pro výpočet transportní rychlosti. Proto byla navržena hypotéza, že kutikula poskytuje alternativní penetrační cestu hydrofilním sloučeninám, tyto místa

jsou známá pod názvem polární póry [93], vodné póry [94] či jako vodou plněné póry, respektive polární cesta penetrace [95]. Podstatou hypotézy bylo, že sorbovaná voda na povrchu listu, respektive kutikuly vytváří klastry umožňující pohyb hydrofilních látek skrz povrch listu [96]. V kutikule je buněčná stěna tvořená z polysacharidů (celulózy, pektinu a hemicelulózy), které jsou zodpovědné za hlavní místa absorpce vody [97]. Na polárním modelu se podílí i síť tvořená z kutinu [95] obsahující neesterové vazby karboxylových skupin [98], estery a hydroxyskupiny [99], a která zodpovídá za sorpci vody.

Dále je důležité zmínit, že tuto cestu může značně ovlivňovat obsah vody v kutikulách, který byl studován ve vědeckých pracích *Chamela* a *Aranda* [100], [101] a tento proces byl nazván jako botnání kutikul. Na základě experimentů bylo prokázáno, že stupeň botnání kutikul se zvyšuje s rostoucím RH nelineárně a silné zvýšení vodní sorpce je dáno vysokými hodnotami RH [99]. Zdrojem vody absorbovaného na kutikulách bylo využito okolního vzduchu, tedy jeho vlhkosti [99] a [100]. Bylo totiž zjištěno, že ačkoli epidermální buňky jsou přítomné v mezofylu listu a jsou zdrojem vody, tak nemají vliv na hydrataci kutikuly, neboť nejsou s ní v přímém kontaktu, tudíž veškerá sorpce vody probíhá jen z vnějšího prostředí. To bylo ověřeno rovněž experimenty za suchých atmosférických podmínek [61]. Se zvyšující se vlhkostí okolního vzduchu nebo po navlhčení povrchu listu sprejem s přídavkem agrochemického přípravku, dochází k vyšší absorbci vody z vnějšího prostředí. Toto zvýšení vlhkosti vede ke vzniku vodných klastrů, které jsou v kontaktu s vnější a vnitřní stěnou kutikuly, ve které hydrofilní složky mohou difundovat skrze kutikulu [61].

Tento model neslouží pouze k popisu sorpce vody na kutikuly v důsledku působení RH a k botnání izolovaných rostlinných kutikul, ale díky němu můžeme zjistit, že penetrační rychlost iontů skrz kutikuly je silně zvyšována se zvyšující se relativní vlhkostí vzduchu [102]–[104].

Transportní cesta přes stomata

Po dlouhou dobu nebylo jednoznačné, zdali se stomata přímo podílejí na příjmu foliárně-aplikovaných látek do listů. Na začátku výzkumu této problematiky bylo předpokládáno, že rozpuštěné látky mohou vstupovat do stomat prostřednictvím infiltrace, která je způsobená hmotnostním tokem skrz póry stomat. Později bylo prokázáno, že stomata jsou chráněna proti kapilární infiltraci vodných roztoků svojí specifickou stavbou [98], a že prostup přes stomata je umožněn pouze pomocí tenzidů o nízkém povrchovém napětí [105], [106].

Mnoho studií ukázalo jasný vliv stomat na foliární příjem látek i bez přídavku surfaktantů [87], [98], [107], [108], ale mechanismus této penetrace zůstal po dlouhou dobu nepochopen. Mezitím byly provedeny některé další experimenty, díky nimž bylo ověřeno, že roztoky a malé částice mohou penetrovat přes póry stomat prostřednictvím difúze, která probíhá podél povrchu ochranných buněk [107], [109]. Bylo prokázáno, že ne všechna stomata přispívají k foliárnímu příjmu látek, neboť dochází k procesům, které mohou redukovat přirozené hydrofobní vlastnosti ochranných buněk kutikuly, čímž jsou aktivována individuální stomata pro transport látek [85], [88], [108], [109]. Se zvyšující se vlhkostí pórů může být využit model kontinuálního kapalného vodného filmu na stomatální stěně, která umožňuje difúzi rozpuštěných látek do vnitřní stavby listu [108], [109]. Byly navrženy různé mechanismy transportů přes stomata, které mohou být zodpovědné za nízký obsah vody a vytvoření tak tenkého filmu vody v pórech, které zapříčiňují – růst bakterií [109], hub [110], epistomatického slizu [111] a uchované hygroskopické částice [108], [112]. Voda vázaná na ochranné buňky a póry stomat je určena interakcemi kapalina–pevná látka.

Značný vliv na transport látek má rovněž chemická a strukturní stavba pórů stomat a určitě i drsnost jejich povrchu. Rozdíly mezi jednotlivými kutikulami jsou dány v kutikulární stavbě, struktuře, smáčivosti povrchu a rozšíření substomatálních kavit. Teoreticky by více hydrofóbní kutikuly anebo

kutikuly se zvýšenou drsností povrchu, měly lépe chránit svůj povrch před tvorbou vodního filmu, ale tento fakt nebyl zatím experimentálně ověřen [113].

2.8 Foliární hnojení

Živiny jsou pro úrodnost půdy a kvalitu rostlin velmi nezbytnými složkami a jejich aplikace může mít řadu podob. Jednou z používaných metod je použití pevných granulí, které se aplikují na pole a po dodání vláhy (umělé zavlažování nebo přírodní v podobě dešťů), dochází k jejich rozpouštění a vstřebávání do půdy a odtud do kořenů rostlin. Tato zažitá metoda byla doplněna o nově nastupující techniku foliárního (listové) hnojení.

Tento způsob hnojení se začal prudce rozvíjet od 50. let 20. století [115]. O novou formu hnojení se začalo zajímat i obyvatelstvo, neboť zpočátku rostl velký strach z používání nové technologie a nových druhů hnojiv, stimulátorů růstu či pesticidů, herbicidů nebo insekticidů. Zejména se lidé obávali znečišťování životního prostředí, půd, řek, podzemních vod. Obavy vzrostly rovněž v oblasti potravinářství, neboť používané nové přípravky zejména fungicidy, pesticidy a herbicidy byly považovány za vysoce „škodlivé“ a jejich používání by mělo nežádoucí dopad na zdraví člověka.

V dnešní době jsou kladeny vysoké nároky na používané agrochemické preparáty, tedy došlo k významnému rozvoji těchto přípravků, že jejich působení má naopak pozitivní vliv na rostliny (např. dlouhodobá trvanlivost potravin, vzrůst plodů, čerstvost atd.). Foliární hnojení využívající například fosfátové nebo draselné soli vyvolalo naopak systémovou ochranu proti rostlinným škůdcům či patogenům u mnoha druhů plodin (okurky, kukuřice, vinná réva, jablka, mango, růže apod.) [115].

Foliární hnojení je proces aplikace živin v kapalném stavu na povrch rostlin prostřednictvím postřikovačů a jim podobných zařízení. Účelem tohoto hnojení bylo zvýšit koncentraci živin na povrchu rostlin a přispět tak k rychlejší výživě rostlin a částečně i půdy. Zároveň bylo zjištěno, že rostliny jsou schopny mnohem výrazněji reagovat na příjem nutričních látek právě prostřednictvím listů než v případě kořenů [116].

Foliární hnojení patří mezi nejúčinnější způsob výživy rostlin, neboť tímto způsobem dochází ke zvýšení výnosu a kvality plodin. Na základě testů bylo dokázáno, že listové hnojení může zvyšovat výtěžek o více než 12 nebo dokonce 25 % v porovnání s konvenčním hnojením [114].

Testy byly realizovány pro různá prostředí a pro různé podmínky. V důsledku jejich výsledků bylo prokázáno, že v případě aplikace nutričních látek přímo na listy rostlin, dochází ke zvýšení využití živin o více než 90 %. V případě užití hnojiva přímo na půdu, dochází k využití asi z 10 %, kdy zbylé množství je odplaveno a nemůže se tak podílet na ovlivňování růstu či kvality rostlin [115].

Zejména v případě písčitých půd, které se vyznačují velmi špatnou úrodností z důvodu nízkého obsahu živin a organické hmoty půdy, je důležité volit vhodnou aplikaci hnojiv, aby výsledek byl co nejefektivnější. V případě užití foliárního typu hnojení jsou takto podané nutriční látky až 20krát více účinné v porovnání s aplikacemi přímo do půdy [114].

Díky využití foliárního typu hnojení není půda zatěžována používanými chemikáliemi, vzhledem k tomu, že aktivní látky jsou transportovány do rostliny skrz listy. Důsledkem foliárního hnojení je nejen zvýšení kvality rostlin a jejich plodů, ale také částečné zvýšení obsahu živin v půdě a jejich transport do rostliny přes kořenový systém. Další výhodou je bezproblémový transport látek do listů, kdy v případě půdního hnojení v období s nedostatkem vláhy nemusí dojít k penetraci do rostlin vůbec.

2.8.1 Klasifikace hnojiv

Při řešení zadání disertační práce byly využity některé komerční přípravky stimulátorů růstu, které se velmi často používají v kombinaci s tradičními hnojivy, tyto přípravky byly získány od firmy Amagro s.r.o. Rovněž byla při skleníkových experimentech využita klasická hnojiva v podobě NPK, proto byla tomuto tématu věnována jedna krátká kapitola.

Hnojiva jsou látky, které dodávají rostlinám a půdě potřebné základní živiny, mezi něž patří dusík, fosfor a draslík. S rostoucím zájmem o výživu rostlin, dřevin a zemědělských plodin byla přírodní hnojiva (kompost, hnůj hospodářských zvířat nebo močůvka) doplněna o hnojiva umělá (syntetická), která ve 20. století dosáhla významných změn, a hlavně velkého rozmachu a vývoje [117].

Hnojiva můžeme dělit dle jejich konzistence na krystalická, granulovaná a kapalná. Dále dle jejich působení na hnojiva přímá (obsahující rostlinné živiny) a nepřímá (umožňující příjem živin). Přímá hnojiva dělíme na hnojiva organická (hnůj, močůvka, tekutý hnůj kompost apod.) a hnojiva minerální (fosforečná, draselná, dusíkatá nebo vápenatá) [118].

Organická hnojiva

Mezi organická hnojiva patří hnojiva na bázi kompostu, hnoje nebo kvašených rostlinných výluh. Jedná se o chemické sloučeniny, které se vyznačují uhlovodíkovým skeletem různé délky s postranními substituenty. Spadají sem bílkoviny, které jsou tvořeny aminokyselinami, rovněž sem patří sacharidy, přičemž nejdůležitějšími pro rostlinu jsou celulóza, lignin, auxiny a jim podobné.

Organické látky se podílejí na tvorbě humusu v půdě a jsou tak nejdůležitější zásobárnou živin vůbec. Organická hnojiva mají velký význam pro rostliny zejména jsou zdrojem důležitých prvků, které byly zmíněny v úvodu kapitoly 2.8.1. Organická hnojiva jsou univerzálním zdrojem stavebního uhlíku, energie, živin a existuje celá řada těchto hnojiv, která se dělí do celé řady skupin, jako jsou rašelina, živočišný hnůj, kompost, sláma, kejda atd. [119].

Rašelina patří mezi kyselá hnojiva [120] a používá se jako substrát pro pěstování zeleniny. Naproti tomu hnojůvka je na mikroorganismy bohatá tekutina, která vzniká jako vedlejší produkt při zrání hnoje a jejím analogem je i močůvka, což je moč hospodářských zvířat, která prošla kvasným procesem a je velmi bohatá na prvky draslíku a dusíku. Dalším významným organickým hnojivem je chlévský hnůj, což je zkvašená chlévská mrva (podestýlka s trusem). Klíčovým organickým hnojivem je určitě kompost, směs zeminy s organickými látkami a půdní mikroflórou [114].

Minerální hnojiva

Minerální hnojiva nahrazují živiny, které byly vyčerpány z půdy během celého ročního období. Ztráty minerálních látek není možné nahradit pouze z humusu nebo živin uvolněných z primárních minerálů, ale je nutné využít právě některých průmyslových hnojiv. Díky nim je možné doplňovat živiny do půdy, a tak zabránit jejich vysokému poklesu, které by mělo fatální následky na její další použití. Živiny mohou být z půdy odčerpávány během období sklizně nebo vyplavením přívaly vody. Bylo zjištěno, že z 1 hektaru pole dochází k odčerpání na 350–650 kg dusíku, fosforu, draslíku, vápníku a hořčíku [121]. Mezi minerální hnojiva patří dusíkatá, fosforečná, vápenatá, hořečnatá a vícesložková.

Dusíkatá hnojiva jsou velmi vítaným zdrojem výživy půdy, neboť dusík je důležitý pro tvorbu listové hmoty. Tento prvek se dále podílí na tvorbě chlorofylu v listech a ostatních částech rostlinného těla. Jeho nedostatkem dochází k chřadnutí listů, což se projevuje jejich zesvětláním, vadnutím a zastavením růstu. V případě nadbytku dusíku v rostlinách může naopak docházet ke ztmavnutí listů, ztenčení listových kutikul či dokonce k popraskání plodů. Dusíkatá hnojiva dělíme podle iontové formy dusíku [118] na nitrátové, amoniakální a amonné [122].

Nitrátová hnojiva

Nejvýznamnějšími nitrátovými hnojivy je ledek vápenatý a ledek sodný. Vápenatá forma je tvořena základní chemickou komponentou, kterou je hydrát dusičnanu vápenatého. Jedná se o hnojivo sloužící k přihnojování ozimých plodin na jaře během jejich vegetace, a to aplikací přímo na listy. Ledek sodný je také výborným hnojivem, avšak jeho velkou nevýhodou je, že při aplikacích vytváří sodný škraloup na zemině, což způsobuje její přesolení, a to vede k negativnímu dopadu na její úrodnost [123].

Mezi nejvýznamnější formy amonného hnojiva patří uhličitan amonný, síran amonný, kapalný amoniak, chlorid amonný a také amoniakální voda. Síran amonný je vhodný pro všechny plodiny rostoucí na neutrálních půdách. Slouží k přihnojování brambor nebo brukvovitých rostlin [123].

Správná aplikace dusíkatých pesticidů může mít za následek vyvážené nutriční látky jak pro rostlinu, tak i pro půdu. Výsledkem může být zvýšení výnosu plodin, avšak při přehnojení nebo naopak nedohnojení dusíkem může mít pro úrodu dalekosáhlé následky, jak již bylo uvedeno v úvodních odstavcích této kapitoly. Aplikace dusíkatých hnojiv je doporučována zejména v těžších a kyselejších půdách, naopak amonná hnojiva najdou své uplatnění v porézních půdách [114].

Fosforečná hnojiva

Fosfor je pro rostliny velmi důležitý, protože se podílí na tvorbě reprodukčních orgánů. Tento typ pesticidů poskytuje takovou formu fosforu, kterou může rostlina případně půda ihned využít. Zpravidla to bývá v podobě NPK perel nebo přidávaného NPK do foliárních přípravků. Tento typ hnojiv byl v historii vyráběn kostní moučkou a koprolitem (zkamenělé výkaly živočichů). Dnes se pro jeho výrobu využívá především fosforitů a apatitů (rudy magmatického původu). Fosforečná hnojiva můžeme rozdělit na rozpustná ve vodě, v citranu amonném, v kyselině citrónové nebo v silných minerálních kyselinách.

Komerčně nejznámějším hnojivem je Thomasova moučka, která patří mezi fosforečná hnojiva vyráběná zpracováním rudy. Nejpoužívanějším apatitem je fluorapatit neboli kolský apatit. Při hnojení fosforem je třeba klást důraz na formu hnojiva a jeho rozpustnost, na půdní vlastnosti (vlhkost, teplota) a především na příjmovou kapacitu hnojené plodiny [114]. Více o porovnávání účinků hnojiv na bázi dusíku a fosforu se zabýval *McClanahan* s kolegy [124].

Draselná hnojiva

Dalším velmi nezbytným prvkem je draslík, který rostlina přijímá v poměrně vysoké míře. Draslík je prvek podílející se na transpiraci, fotosyntéze, při metabolismu sacharidů a dále se podílí na dělení buněk a na aktivitě enzymů. Draslík se také podílí na regulaci vody v rostlinných tělech. Přísun draslíku je doprovázen dalšími nezbytnými biogenními prvky, jako jsou bor, hořčík či vápník. Tento typ hnojiv je vyráběn z ložisek draselných solí, jejich výroba spočívá v evaporaci mořské vody, která je na tyto prvky velmi bohatá [114].

Nejznámějšími draselnými soli je karnalit (podvojná sůl chloridu draselného a hořečnatého), sylvanit (směs chloridu draselného a sodného), kainit (směs chloridu draselného a síranu hořečnatého) a kainit II, který je směsí kainitu a chloridu sodného. Působením účinků draselných hnojiv na úrodnost se zabýval *Santos* s kolegy v publikaci [125].

Vápenatá hnojiva

Hlavním zdrojem vápníku na výrobu vápenatých hnojiv jsou horniny vápenaté a hořečnato-vápenaté. Tento druh hnojiv rozdělujeme podle formy, ve které je vápník navázaný, tedy na hnojiva uhličitanová, síranová, žíravá (hydroxid nebo oxid vápenatý) a křemičitanová. Zdroje vápníku se

aplikují přímo (po rozemletí) nebo po chemické úpravě (pálení vápenatých hornin nebo hašení páleného vápna) [114].

Vápník je rostlinami a půdou přijímán ve formě kationtu vápenatého, který je důležitý pro tvorbu kořenového systému a hraje také roli v metabolickém procesu rostlin. Nedostatek tohoto prvku se projevuje zastavením růstu a postupným odehníváním kořenového balu. Další negativní dopady se mohou projevit na skeletu rostlin například blednutím listů nebo jejich zakřivením [114].

V dnešní době se hnojiva různě kombinují, čehož také využili ve své práci *Liu, Wu* a *Chang* [126]. Ti využili alginátu vápenatého jako jakousi nosnou matrici pro hnojiva na bázi fosforu, které jsou tak pozvolna uvolňována do půdy.

Hořečnatá hnojiva

Hořčík hraje nezastupitelnou úlohu při fotosyntetických procesech, je totiž součástí molekuly chlorofylu (jádro s centrálním atomem hořčíku). Nedostatek tohoto prvku způsobuje různé formy chloróz a nekróz rostlinných pletiv [114]. Studiem pozitivních účinků hořečnatých hnojiv a jejich porovnání s jinými typy hnojiv se zabýval rovněž *Santos* v publikaci [125].

2.8.2 Přehled použitých komerčních materiálů na bázi huminových látek

Společnost Amagro s.r.o. se zabývá vývojem, výrobou a distribucí zemědělských přípravků na bázi huminových látek, které jsou prodávány pod obchodní značkou Lignohumát (angl. *Lignohumate*). Tyto látky jsou k dostání v práškové či kapalné formě, které jsou využívány jako přísady k běžně užívaným hnojivům, pesticidům, insekticidům a jim podobných či mohou být používány samostatně jako stimulátory růstu. Lignohumát přípravky jsou vhodné jak pro velkotržní spotřebitele, tak pro malé zahrádkáře.

V rámci dizertační práce byly použity pouze některé přípravky firmy Amagro s.r.o., které byly použity jak pro simulace foliární hnojení, tak pro skleníkové experimenty a inkubační testy. Z tohoto důvodu byly jednotlivé použité preparáty shrnuty do krátkých odstavců popisujících složení přípravků a jejich vliv na rostliny.

Lignohumát A (LH) je práškový přípravek tvořený z fulvinových kyselin a dalších nízkomolekulárních částí huminového spektra. V přípravku je deklarováno minimálně 50 % fulvinových kyselin a maximálně 50 % draselných solí huminových kyselin. Pozitivní účinek se projevuje nárůstem asimilační plochy, rostlinné porosty jsou vitálnější, barvy jsou sytější a celková kondice rostliny je viditelně lepší a zdravější. Lignohumát A rovněž pomáhá rostlinám vyrovnávat se se stresovými podmínkami a rostliny jsou schopny se rychleji regenerovat. Přípravek je vhodný pro kombinace s běžnými listovými hnojivy či přípravky pro chemickou ochranu rostlin [127].

Lignohumát AM (LH AM) je modifikace výše zmíněného Lignohumátu A. Jedná se o práškovou formu, která je snadno rozpustná ve vodě (maximálně 12 hm. %). Jeho hlavní odlišností je, že jeho mikroelementy se vyskytují v chelatové podobě, EDTA (ethylendiamintetraacetát). Tento přípravek je velmi často používaný pro hydroponické pěstování rostlin. Celkově má tento přípravek pozitivní vliv na růst, kvalitu a výnosnost rostlin. Lignohumát AM je možné využít jak samostatně, tak v kombinaci s jinými foliárními hnojivy či chemickými přípravky používanými pro regulaci škůdců, hub apod. [127].

Ligno Aktivátor (LH AK) je prášková homogenní směs huminových látek a extraktu z hnědé mořské řasy. Přesněji je tvořen okysličeným lignosulfonanem s vysokým obsahem fulvinových kyselin, a navíc je obohacen o extrakt z hnědých mořských řas (lat. *Ascophyllum nodosum*), čímž přípravek obohacuje o přírodní aminokyseliny, oligopeptidy a auxiny. Přípravek má příznivý a komplexní vliv na rostliny, neboť stimuluje jejich kořenový systém, pozitivně působí na průběh

fotosyntézy a stimuluje růst rostlin. Tento přípravek působí pozitivně v náročných podmínkách, jako jsou velké výkyvy teplot, jarní mrazy, přesolování aj. Ligno Aktivátor podporuje tvorbu bočního kořenového systému, díky čemuž jsou rostliny schopny lépe využít vláhu a dodané živiny [127]. Tento přípravek bude v budoucnu testován pro přípravu superabsorbentů a jejich vliv na rostliny.

Vitalic je vodou mísitelný rostlinný stimulátor obsahující koncentráty lignohumátu draselného, nitrofenolátů a nitroguajakolátu draselného. Tento produkt pozitivně působí na buněčnou stavbu rostlin, do níž proniká díky přítomným huminovým a fulvinovým kyselinám. Vitalic působí rovněž pozitivně na rozšíření vedlejšího kořene. Díky bioaktivním látkám se aktivně zapojuje do metabolismu rostlinné buňky, kromě toho i do obranných mechanismů rostliny. Rostliny rychleji regenerují při abiotickém nebo biotickém stresu [127].

2.9 Difúzní procesy

Předložená disertační práce se zabývá simulacemi foliárního hnojení, které jsou založeny na difúzi kapalných látek skrz rostlinné kutikuly. Pro realizaci experimentů byly využity dva modely, model v polonekonečné desce neboli volná difúze a stacionární difúze v tzv. difúzním páru. Vzhledem k navrženým modelům byla vypracována kapitola o difúzních procesech, které souvisejí s modely reálných experimentů a jejich matematické aparáty (kap. 2.9.3 a 2.9.4), které byly využity pro sestavení matematického popisu laboratorních experimentů.

2.9.1 Obecné principy difúzních procesů

Pod pojmem difúze nejčastěji rozumíme proces samovolného vyrovnávání koncentrací v prostředí s gradientem chemického potenciálu. Jinak řečeno jde o mikroskopický transport látek z míst s vyšší koncentrací do míst s nižší koncentrací, tedy ve směru koncentračního gradientu, a to až do stavu rovnováhy. Prostředí, ve kterém se pohyb částic uskutečňuje, se jeví z makroskopického hlediska jako nehybná fáze (resp. fáze, která se nepohybuje jako celek). Neuspořádaná mobilita těchto částic je způsobena tzv. Brownovým pohybem [128].

Modelovým příkladem je horizontální uspořádání dvou objemových elementů, které jsou zcela stejné, jen se odlišují svými koncentracemi. Nechť spodní element má vyšší koncentraci než objemový element nad ním. Sledujeme-li pohyb frakce molekul v určitém časovém intervalu, potom můžeme pozorovat přechod určité části molekul z míst vyšší koncentrace (spodní element) do míst s nižší koncentrací (horní element) a naopak, tedy musí dojít k transportu stejné frakce částic i z méně koncentrované oblasti, tedy difundovat bude i rozpouštědlo. Z makroskopického hlediska je na transport sledované látky pohlíženo jako na pohyb částic ve směru klesající koncentrace [129]. Z této celé situace vyplývá velmi důležitá vlastnost látek a tou je; pokud jsou částice schopny se pohybovat v celém prostoru, potom postupně dochází k vyrovnávání jejich koncentrace v objemovém elementu.

Hlavní hnací silou difúzních procesů je rozdíl chemického potenciálu transportované složky ve dvou místech, mezi kterými se transport uskutečňuje. Ze spojení prvních dvou základních termodynamických zákonů vyplývá, že systém s konstantní teplotou a tlakem vykonává maximální objemovou práci a odpovídá přenosu jednoho molu látky z místa o chemickém potenciálu μ na místo o chemickém potenciálu $\mu + \mathrm{d}\mu$. V takovém případě se neobjemová práce $\mathrm{d}w = \mathrm{d}\mu$, kde chemický potenciál závisí na poloze x. Zároveň můžeme tvrdit, že změna Gibbsovy energie je rovna maximální práci (jiné než objemové) [130]. Tuto situaci vystihuje rovnice (4):

$$\mathrm{d}w = \left(\frac{\partial \mu}{\partial x}\right)_{p,T} \mathrm{d}x. \tag{4}$$

Práci můžeme také vyjádřit obecnou rovnicí síly F:

$$\mathrm{d}w = -F \cdot \mathrm{d}x. \tag{5}$$

Porovnáním rovnic (4) a (5) vyplývá, že směrnice chemického potenciálu má význam efektivní síly na 1 mol molekul. Síla působící v opačném směru je definována následujícím vztahem (6):

$$F = -\left(\frac{\partial \mu}{\partial x}\right)_{p,T}, \tag{6}$$

čímž obdržíme definici *termodynamické síly*.

Tato síla vyjadřuje spontánní tendenci rozptylování částic, jejíž podstata je podle druhého termodynamického zákona v tom, že chemický systém vždy zvyšuje svou entropii neboli míru neuspořádanosti, čímž dospěje ke stavu s nejnižší vnitřní energií [131].

Rychlost difúzních procesů je přímo úměrná velikosti částic a zároveň nepřímo úměrně závisí na odporu prostředí, ve kterém difúze probíhá. Další aspekty, které mohou také ovlivňovat průběh difúze, jsou interakce mezi částicemi (chemické reakce). Obecně lze ale tvrdit, že difúze, v porovnání s jinými molekulárními procesy, je méně teplotně závislá [132].

Některé nežádoucí jevy při difúzních procesech je možné omezit za použití hydrogelových fází, které zároveň přináší celou řadu dalších výhod. Například elektrická vodivost u těchto materiálů je téměř stejně vysoká jako v původním solu. Pokud porovnáme difuzivitu nízkomolekulárních látek v hydrogelech a v roztoku, potom zjistíme, že její hodnota v gelových fázích je o něco menší, což je zapříčiněno vyšší viskozitou gelu. Toto snížení je ovšem překvapivě malé, uvažujeme-li, že k pohybu molekul dochází jen v prostorách mezi 3D sítí. Síťová struktura gelových systémů navíc značně potlačuje nežádoucí proudění a tepelnou konvekci, která je u kapalných prostředí typická, což je výhodné především z hlediska experimentálního pozorování difúzních procesů.

2.9.2 Fickovy zákony

Difúzní procesy, jsou spjaty s tepelnou konvekcí. Souvislostmi mezi těmito dvěma ději se zabýval německý fyzik *Adolf Eugene Fick*, který jako první položil základy difúze a elementárně popsal princip difúze. Tyto hypotézy se mu dařilo ověřit na základě experimentů, díky nimž vytvořil Fick matematický aparát popisující difúzní jevy [23].

V případě difúzních procesů je nutné si uvědomit, že se nejedná o mobilitu jedné látky, nýbrž všech látek v systému, které se transportu účastní. Rovnice, které jsou uvedeny níže, popisují pouze jednu difundující látku, nikoli však celý systém. Popisujeme-li soustavu, ve které se na transportu podílí 2 látky, potom je tento systém popsán 2 takovými rovnicemi. Zároveň je nutné si uvědomit, že difúzní tok jedné látky je spřažen s tokem látky druhé. V případě, že difúzní tok složky 1 je způsobený jejím koncentračním gradientem, potom musí existovat difúzní tok složky 2, který je způsobený opačným koncentračním gradientem složky 2 vůči složce 1 [133]. Proto pro tento případ není nutné difúzní jevy popisovat dvěma složkami.

Probíhá-li difúze ve směru jedné osy, jedná se o jednorozměrnou difúzi, kterou lze popsat jednoduchou rovnicí (7), která se nazývá jako *první Fickův zákon*:

$$j = -D \cdot \frac{\partial c}{\partial x}, \tag{7}$$

kde j znázorňuje difúzní tok látky, tedy jaké množství difundované látky projde jednotkovou plochou systému za jednotkový čas. Tato veličina je popsána jednotkou $\mathrm{mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}}$. Symbol c představuje molární koncentraci dané látky a symbol x je vzdálenost od rozhraní dvou prostředí. Symbol D je difúzní koeficient, který charakterizuje míru mobility molekul v dané látce a často je označován také pojmem difuzivita. Jedná se o velmi důležitý parametr, díky němuž můžeme difúzní procesy porovnávat, zároveň se jedná o rozměrovou veličinu, která nabývá jednotek $\mathrm{m^2 \cdot s^{-1}}$. Znaménko mínus v rovnici vystihuje difúzní proces, který probíhá proti směru koncentračního gradientu.

Druhý Fickův zákon vyjadřuje závislost mezi rychlostí změny koncentrace a gradientem koncentrace. Navíc uvažuje změnu koncentrace v závislosti na čase [129]. Tento zákon je zapsán rovnicí ve tvaru (8) (je-li D nezávislé na koncentraci difundující látky):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{1}{\mathrm{A}} \cdot \frac{\partial \mathrm{A} \partial c}{\partial x \partial x}\right). \tag{8}$$

V případě, že je plocha A konstantní, difúzní koeficient nezávislý na koncentraci c a difúzní proces probíhá pouze v jednom směru, potom získáme zjednodušený tvar rovnice (9):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}. \tag{9}$$

2.9.3 Jednoduché difúzní modely

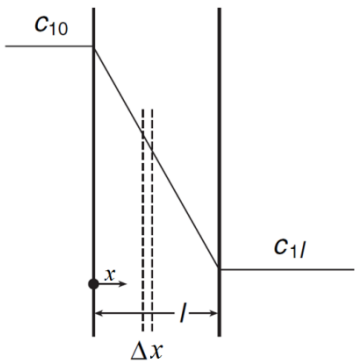
Řešení rovnic (8) a (9) jsou pro dané podmínky často velmi komplikovaná. Existuje celá řada publikací zabývající se problematikou transportu látek, do nichž hojně přispěl britský fyzik a matematik *John Crank* [130].

V této kapitole budou popsány následující případy difúzních experimentů: *stacionární difúze přes tenký film, membránová difúze a difúze do nekonečně dlouhého média v jednom směru,* jinak nazývaného jako *volná difúze*.

Stacionární difúze skrz tenký film

Pro matematický zápis stacionární difúze přes tenký film vycházíme ze základního Fickova zákona, rovnice (9). Cílem je zjistit difúzní tok látky a koncentraci na rozhraní, tedy kolik rozpuštěné látky projde přes film a jak se případně změní koncentrace uvnitř filmu. Tento model při experimentálním studiu difúzních procesů často doplňuje model difúze v nekonečné desce (viz níže) pro případ extrémně dlouhých časů (difundující látka penetruje skrz studované medium mezi dvěma dalšími prostředími). Difúze je v místě průchodu tenkým filmem nezávislá na čase, od čehož dostala pojmenování *stacionární* neboli *ustálená difuze* [129].

Stacionární difúze přes tenký film je ilustrována na Obr. 19. Tento model předpokládá jednosměrnou difúzi mezi dvěma dobře míchanými zředěnými roztoky, která probíhá dostatečně dlouhou dobu. Pozorujeme tak systém, mezi nimiž se nachází tenká difúzní bariéra. Roztok difunduje z vyšší koncentrace c_{10}, z místa $x \leq 0$ na levé straně filmu, do roztoku s nižší koncentrací c_{1l}, z místa $x \geq l$ na pravé straně. Pokud nedochází v difúzním filmu k akumulaci látky, potom tok směrem do filmu je stejný jako tok z filmu a difúze je tedy ustálená.



Obr. 19 Difúze skrz tenký film [129].

Protože jde o stacionární stav, naakumulovaná rozpuštěná látka odpovídá hodnotě 0 a difúzní rychlost je definována jako difúzní tok prošlý plochou filmu za jednotkový čas t:

$$0 = A(j_x - j_{x+\Delta x}). \quad (10)$$

Rozdělením rovnice objemem filmu, $A\Delta x$, vede k přeskupení:

$$0 = \left(\frac{j_{x+\Delta x} - j_x}{(x+\Delta x) - x}\right), \quad (11)$$

kde je Δx velmi malé, potom derivace rovnice vypadá následovně:

$$0 = -\frac{\mathrm{d}}{\mathrm{d}x} j. \quad (12)$$

Kombinací rovnic (12) s Fickovým zákonem (7), získáme:

$$-j = D\frac{\mathrm{d}c}{\mathrm{d}x}. \quad (13)$$

Pro konstantní difúzní koeficient D pak platí:

$$0 = D\frac{\mathrm{d}^2 c}{\mathrm{d}x^2}. \quad (14)$$

Tato diferenciální rovnice je limitována dvěma okrajovými podmínkami:

$$x = 0,\ c = c_{10}, \quad (15)$$

$$x = l,\ c = c_{1l}. \quad (16)$$

Vzhledem k tomu, že jde o stacionární stav, koncentrace c_{10} a c_{1l} jsou nezávislé na čase a fyzicky musí platit, že objem sousedního roztoku musí být větší než objem filmu.

Matematický popis

Požadovaný koncentrační profil a difúzní tok je poté možné snadno stanovit pomocí dvojí integrace rovnice (14), čímž je získán vztah ve tvaru:

$$c = a + bx, \quad (17)$$

kde c je koncentrace, respektive koncentrační profil a symboly a a b jsou konstanty odpovídající podmínkám (15) a (16). Koncentrační profil je možné vypočítat dle vztahu (18):

$$c = c_{10} + (c_{1l} - c_{10})\frac{x}{l}, \text{ resp.} \quad (18)$$

$$\frac{c - c_{10}}{c_{1l} - c_{10}} = \frac{x}{l}, \quad (19)$$

kde c_{10} je koncentrace ve zdrojové cele, c_{1l} je koncentrace v přijímací cele, x je vzdálenost částic prošlých filmem a l je tloušťka filmu.

Z rovnice (14) a (18) je zřejmá lineární závislost koncentračního profilu v bariéře, kterou je možné ovlivnit okrajovými podmínkami a tloušťkou filmu, nikoli však difúzním koeficientem. Difúzní tok totiž není časově závislý a celkové množství látky transportované skrz tenkou vrstvu roste s časem lineárně dle rovnice (20):

$$j = -D\frac{\mathrm{d}c}{\mathrm{d}x} = \frac{D}{l}(c_{10} - c_{1l}). \quad (20)$$

Membránová difúze

Obdobným případem je difúze přes membránu, kde je systém tvořený dvěma dobře míchanými roztoky oddělenými membránou, kde na fázovém rozhraní dochází ke skokové změně koncentrace, která je zapříčiněna koncentračním gradientem [129].

Sestavením materiálové bilance získáme analogickou rovnici k rovnici (10), kde integrací získáme rovnici (14). Hmotnostní rovnováha tohoto procesu je určena okrajovými podmínkami:

$$x = 0,\ c = Hc_{10}, \tag{21}$$

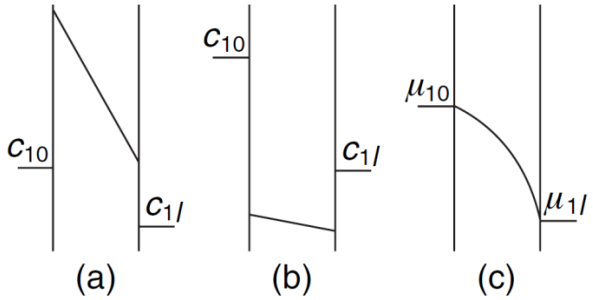
$$x = l,\ c = Hc_{1l}, \tag{22}$$

kde H je rozdělovací koeficient, který popisuje koncentrační skok na rozhraní mezi membránou a sousedním roztokem. Symbol c opět značí koncentrační profil, c_{10} koncentraci zdrojové cely, c_{1l} koncentraci přijímací cely, symbol x znázorňuje vzdálenost částic prošlých z jednoho místa o vyšší koncentraci do místa s nižší koncentrací a l je tloušťka membrány.

Koncentrační profil tedy odpovídá tvaru:

$$c = Hc_{10} + H(c_{1l} + c_{10})\frac{x}{l}, \tag{23}$$

který vychází z rovnice (18). Celou situaci popisuje Obr. 20, který znázorňuje koncentrační skok na rozhraní.



Obr. 20 Koncentrační profil skrz tenkou membránu – (a) rozpuštěná látka je více solubilizovaná v membráně než v sousedním roztoku, (b) působí s menší mírou, (c) oba případy korespondují s chemickými potenciálovými gradienty [129].

Jestliže je látka méně rozpustná v membráně, pak její koncentrace poklesne. Na Obr. 20 je uveden příklad znázorňující celou situaci. Na levé straně membrány je rozpuštěná látka difundující z roztoku o koncentraci c_{10} do membrány, kde dochází k jejímu zakoncentrovávání, a tedy zvýšení koncentrace oproti zdrojovému roztoku o koncentraci c_{10} [129]. Difúze může často nastat z oblasti nižší koncentrace do oblasti s vyšší koncentrací, což je základ pro mnoho extrakcí v systému kapalina-kapalina. Tento typ difúze je způsoben rozdílným chemickým potenciálem rozpuštěné látky v sousedních fázích. Jak je patrné z Obr. 20, ačkoliv se na rozhraní těchto fází objevuje koncentrační skok, chemický potenciál se na membránovém rozhraní nemění a dochází zde k rovnováze. Tento potenciál, který klesá plynule s klesající koncentrací (Obr. 20c), je hnací sílou odpovědnou za difúzi [129].

Tok skrz tenkou membránu můžeme řešit jako kombinaci předcházející rovnice s Fickovým zákonem, čímž byla získána rovnice:

$$j = \frac{[DH]}{l}(c_{10} - c_{1l}), \tag{24}$$

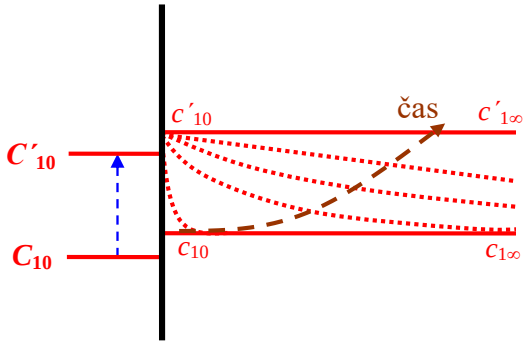
kde opět j je celkový tok, D je difúzní koeficient, H je rozdělovací koeficient, c_{10} je koncentrace ve zdrojové cele a c_{1l} je koncentrace v přijímací cele.

Tento vztah je opět paralelou k rovnici (20). Člen v hranaté závorce se nazývá *permeabilita* a stanovuje se experimentálně. Člen $[DH]/l$ se nazývá *permeance*. Rozdělovací koeficient H se často mění ve větší míře než difúzní koeficient D, potom rozdíly v difúzních koeficientech molekul nejsou tolik důležité jako rozdíly v rozpustnosti těchto látek.

Difúze v polonekonečné desce neboli volná difúze

V modelu volné difúze předpokládáme médium, které je natolik dlouhé, že molekuly nedosáhnou nikdy jeho konce. Navíc je předpokládáno, že celý experiment začíná na rozhraní. Takovým médiem může být plyn, kapalina nebo pevná látka.

Tento model si můžeme představit jako médium, které má na počátku experimentu konstantní koncentraci látky 1. Náhlým zvýšením její koncentrace na rozhraní dojde ke vzniku koncentračního gradientu a látka začíná difundovat hlouběji do média (Obr. 21).



Obr. 21 Volná difúze – na začátku je v médiu konstantní koncentrace $c_{1\infty}$. Zvýšením roztoku na rozhraní dochází k vytvoření časově proměnného koncentračního profilu [23].

Změnou koncentrace na rozhraní vznikne časově proměnný koncentrační profil látky 1 v médiu. Cílem řešení problému je zjistit, jak se mění koncentrační profil difundující látky se změnou její koncentrace na rozhraní a s časem [129].

Řešení se získá z diferenciální rovnice (14) pro okrajové podmínky:

$$t = 0, \text{ všechna } x,\ c = c_{1\infty} \tag{25}$$

$$t > 0,\ x = 0,\ c = c_{10} \tag{26}$$

$$x = \infty,\ c = c_{10} \tag{27}$$

zavedením substituentu $\zeta = \frac{x}{\sqrt{4Dt}}$ získáme rovnici ve tvaru:

$$\frac{c - c_{10}}{c_{1\infty} - c_{10}} = \operatorname{erf} \frac{x}{\sqrt{4Dt}} \tag{28}$$

$$j = \sqrt{\frac{D}{\pi t}}\, e^{-(x^2/4Dt)} (c_{10} - c_{1\infty}), \tag{29}$$

kde $c_{1\infty}$ je koncentrace v polonekonečném přijímacím médiu a *erf* je tzv. error function.

Z rovnice (29) je zřejmé, že tok je závislý od polohy a času. Stejně jako tomu bylo v případě tenkého filmu, zdvojnásobením koncentračního rozdílu dojde ke zdvojnásobení toku, ovšem zdvojnásobením difúzního koeficientu dojde ke vzrůstu toku pouze na svůj √2násobek, naopak u modelu tenkého filmu by došlo ke dvojnásobnému vzrůstu toku.

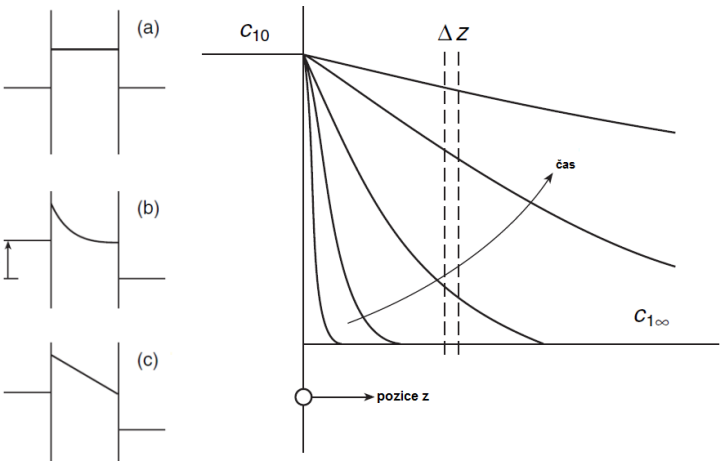
Integrací rovnice (29) pro okrajové podmínky $x = 0$ a čas v rozmezí $t = 0$ a $t = t_0$, získáme:

$$n = \sqrt{\frac{4Dt_0}{\pi}} (c_{10} - c_{1\infty}). \tag{30}$$

Ze vztahu (30) vyplývá, že celkové množství látky *n* přenesené přes jednotkovou plochu je funkcí odmocniny z času a pro jeho zdvojnásobení musí být doba difúze čtyřnásobná [23]. Jednotkou celkového množství látky *n* je mol/m^2.

Vzhledem k difúzním experimentům uskutečněných v této práci, které probíhají přes kutikulární membránu, dochází ke skokové změně koncentrace na rozhraní. Systém přestavují dvě skleněné komory o stejné koncentraci a stejném objemu, které jsou oddělené tenkou membránou. Celý systém setrvává v klidu a v rovnováze. Náhle dojde k rapidnímu zvýšení koncentrace na levé straně rozhraní. Na začátku experimentu je koncentrace na pravé straně nezměněna, ale s délkou experimentu se systém začne chovat jako limita vedoucí ke stacionárnímu stavu. A právě na tomto začátku se systém chová jako „polonekonečná“ deska [129].

Model volné difúze je schematicky ilustrován na Obr. 22.



Obr. 22 Nestacionární vs. stacionární difúze (vlevo). Ilustrace volné difúze (vpravo) [129].

Celou situaci (Obr. 22 – vlevo) je možné popsat následovně. V případě, že skleněná komora zpočátku obsahuje stejnou koncentraci roztoku na obou stranách membrány označené jako $c_{1\infty}$, mluvíme o případu (a). Avšak dojde-li k následnému zvýšení koncentrace na rozhraní, ačkoli je roztok stále brán jako vysoce zředěný, nastane situace (b). V poslední části (c) dochází k vzrůstající produkci časové závislosti koncentračního profilu a difúzního toku, k čemuž potřebujeme hmotnostní rovnováhu vztaženou na tenkou vrstvu, jejíž objem odpovídá $A\Delta x$ [129].

Matematické vyjádření vypadá následovně:

$$\frac{\partial}{\partial t}(A\Delta x c_1) = A(j_x - j_{x+\Delta x}) \tag{31}$$

Poděním $A\Delta x$ získáme rovnici ve tvaru:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\left(\frac{j_{x+\Delta x} - j_x}{(z+\Delta z) - z}\right). \tag{32}$$

Platí-li pro Δz, že je to limita jdoucí k 0, potom rovnici upravíme a získáme vztah ve tvaru:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = \frac{\partial j_1}{\partial z}. \tag{33}$$

Kombinací rovnice (33) s rovnicí pro první Fickův zákon (7), získáme rovnici (9) odpovídající druhému Fickova zákonu. Pro tuto rovnici platí následující okrajové podmínky:

$$t = 0, \text{ pro všechna } z,\ c_1 = c_{1\infty}, \tag{34}$$

$$t > 0,\ z = 0,\ c_1 = c_{10}, \tag{35}$$

$$z = 0,\ c_1 = c_{1\infty}, \tag{36}$$

kde $c_{1\infty}$ a c_{10} jsou konstanty. Koncentrace $c_{1\infty}$ je konstanta, protože je tak daleko od rozhraní, než aby mohla být ovlivněna. Koncentrace c_{10} se udržuje konstantní přidáním materiálu na rozhraní [129].

Matematickým řešením rovnice za těchto okrajových podmínek je:

$$\frac{c_1 - c_{10}}{c_{1\infty} - c_{10}} = \mathrm{erf}\zeta, \tag{37}$$

kde chybová funkce ζ odpovídá:

$$\mathrm{erf}\zeta = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\zeta} e^{-s^2} \mathrm{d}s. \tag{38}$$

To je požadovaný koncentrační profil změny koncentrace s polohou a časem. Kombinace rovnice (38) s rovnicí pro druhý Fickův zákon (9), získáme rovnici ve tvaru (39).

$$j_1 = -D \frac{\partial c_1}{\partial z} = \sqrt{\frac{D}{\pi t}} \mathrm{e}^{-z^2/4Dt} (c_1 - c_{10}), \tag{39}$$

kde z je limita jdoucí k nule (z = 0).

$$j_{1|z=0} = \sqrt{D/\pi t} (c_{10} - c_{1\infty}), \tag{40}$$

tok *j* je funkcí času.

2.9.4 Difúzní koeficient a jeho stanovení

Následující kapitola bude věnována stanovení difuzního koeficientu. V minulosti bylo stanovení difuzního koeficientu poměrně složitou záležitostí, avšak s postupem času se stalo měření difuzního koeficientu běžnou záležitostí, k čemuž hojně přispěly rozvíjející se analytické metody. Dosáhnout jeho přesné hodnoty je poměrně náročné. Difuzní metody, které budeme využívat pro náš typ experimentů, umožňuje stanovení difuzního koeficientu s 5–10 % chybou. Samozřejmě, že v dnešní pokročilé době se najdou mnohem přesnější metody, ovšem námi navržené difúzní modely jsou levné a nenáročné, proto výše zmíněná odchylka je v souladu s použitou metodou [134].

Stanovení difuzního koeficientu metodou difuzní pár polonekonečných médií

Tato difúzní technika je vhodná pro stanovení difúzního koeficientu u látek pevného či kapalného skupenství, proto je vhodná i pro námi navržené experimenty. Jedná se o dva vzorky, které mají různé koncentrace a látka tak difunduje z míst vyšší koncentrace do míst s nižší koncentrací a transport látky probíhá samovolně. Oba vzorky jsou na začátku experimentu k sobě připevněny a po uplynutí námi zvolené doby experimentu jsou vzorky rozpojeny a analyzovány.

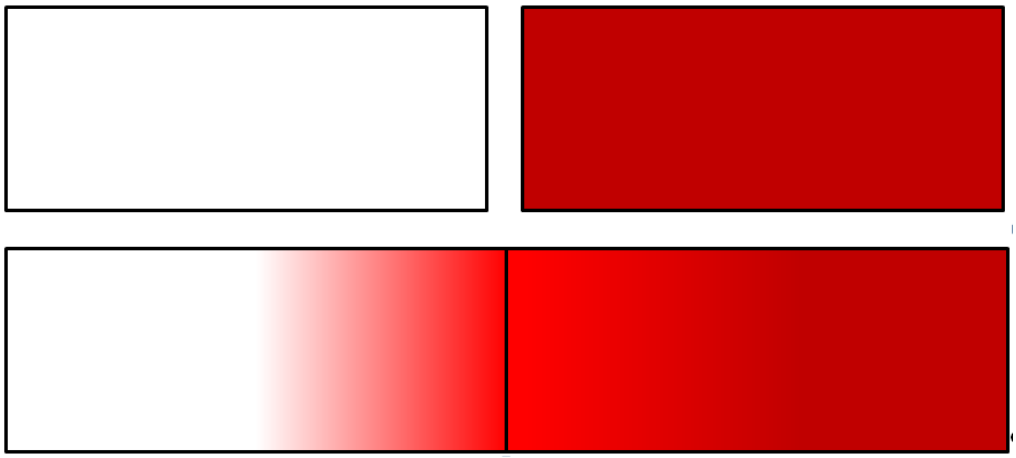
Z měření je možné zjistit úbytek, resp. nárůst koncentrace látky, a to v různých vzdálenostech od rozhraní např. po 1 mm. Z dat můžeme získat koncentrační profily měřených experimentů a celkový tok difundující látky do media. Použitím rovnic (39) a (40) stanovíme difúzní koeficient *D*.

$$\frac{c_1 - \bar{c}_1}{c_{1\infty} - c_1} = \mathrm{erf}\,\frac{x}{\sqrt{4Dt}}, \tag{41}$$

$$n_1 = \sqrt{\frac{4Dt_0}{\pi}} \left(\bar{c}_1 - c_{1\infty}\right), \tag{42}$$

kde $c_{1\infty}$ je koncentrace v přijímací části, $\bar{c}_1$ je konečná koncentrace na rozhraní (daná aritmetickým průměrem c_1 a $c_{1\infty}$) a n_1 je celkové množství transportované látky skrz rozhraní za čas t_0.

Metoda nekonečného difúzního páru je znázorněna na Obr. 23, experimenty tohoto typy musí probíhat za konstantní teploty, takže hned na samém začátku musí dojít k vytemperování vzorků, neboť difúze je na teplotě silně závislá.



Obr. 23 Stanovení difúzního koeficientu metodou nekonečného difúzního páru [134].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 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 (kap. 2.7) 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 studiem 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.

3.1.1 Enzymatická metoda izolace

Metoda dle W. H. Orgella

Wallace H. Orgell [135] 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 pufrem 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 zabraňující 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 temperací 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 sítem byly ponořeny do nádoby s vodou, kde došlo po několika omytí k odplavení odumřelých pletiv a na sítu 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 [135] 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.* (Pepřinec), *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* [136], kteří využili Orgellových [135] 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 [136]. Pro svůj výzkum vycházeli z poznatků *W. H. Orgella* [135], 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 [136].

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 celulázy, protože celuláza je ještě levnější než samotná pektináza, čímž byly ještě více sníženy náklady na experimenty [136].

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 [136].

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 [135] se rovněž inspiroval *Darlington a Cirulis* [137], 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. Nádobu 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).

3.1.2 Chemická metoda izolace

Mnohem drastičtější metodou izolace rostlinných kutikul se zabýval *Edgington* [138], 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 pomocí 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 [138].

Obdobného procesu izolace využili *Edgington* a *Solel* v roce 1973 [139], 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 [139].

3.2 Studium transportu kapalných látek přes rostlinné kutikuly

Podrobné review o foliárním příjmu rostlin vypracovali *Wang* s *Liuem* [140]. 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 [141] 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 [142]. 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.

Výsledky práce [141] byly zpracovávány na základě rovnice (43):

$$\text{Příjem (\%)} = \left[\left(\frac{\frac{{}^{t}A_{\text{gp}}}{{}^{t}A_{\text{gc}}}}{\frac{{}^{0}A_{\text{gp}}}{{}^{0}A_{\text{gc}}}}\right) - \left(\frac{\frac{{}^{t}A_{\text{pp}}}{{}^{t}A_{\text{pc}}}}{\frac{{}^{0}A_{\text{pp}}}{{}^{0}A_{\text{pc}}}}\right)\right] \times 100, \quad (43)$$

kde ${}^{t}A_{\text{gp}}$ je plocha píku fungicidu měřeného od skleněné desky v čase *t*, ${}^{t}A_{\text{gc}}$ je plocha píku barviva Congo Red měřeného od skleněné desky v čase *t*, ${}^{0}A_{\text{gp}}$ je plocha píku fungicidu měřeného od skleněné desky v čase 0, ${}^{0}A_{\text{gc}}$ je plocha píku barviva Congo Red měřeného od skleněné desky v čase 0, ${}^{t}A_{\text{pp}}$ je plocha píku fungicide měřeného od listu v čase *t*, ${}^{t}A_{\text{pc}}$ je plocha píku barviva Congo Red měřeného od listu v čase *t*, ${}^{0}A_{\text{pp}}$ je plocha píku fungicidu měřeného od listu v čase 0, ${}^{0}A_{\text{pc}}$ je plocha píku barviva měřeného od listu v čase 0.

Velmi významnou publikací zabývající se mobilitou pesticidů a stanovováním rychlosti penetrace látek pro foliární příjem popisují *Bauer* a *Schönherr* [143], [144]. 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 [145], kteří se zabývali transportem látek do vnitřní struktury listů rostlin.

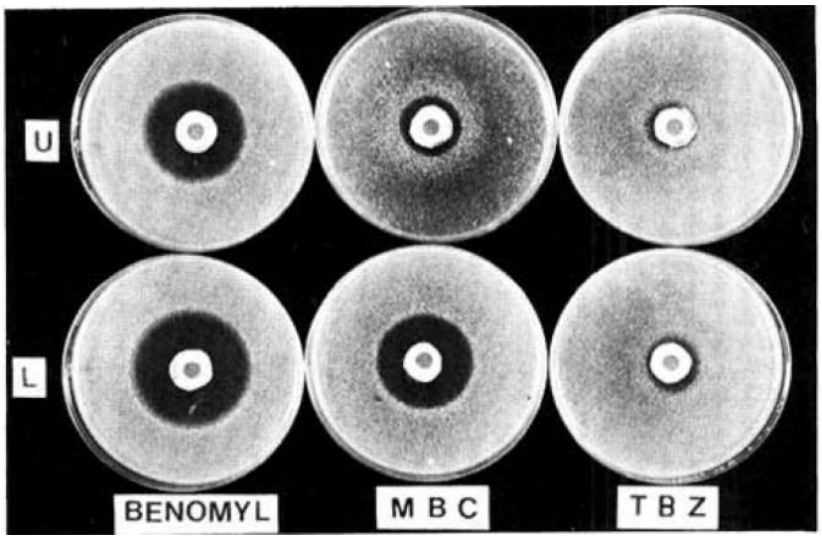
Studiem transportu a charakteru voskových kutikul se zabýval *Santier* et al. [146]. V jeho publikaci byla penetrace hydrofilních a hydrofobních sloučenin skrz izolované rostlinné kutikuly zkoumána v uzavřeném difúzním systému (kutikula/agar). Kutikuly, které byly pro tyto experimenty vybrány, reprezentovaly 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* [147]. 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. 24).

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 níž 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* [148]. 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. 24) [148].

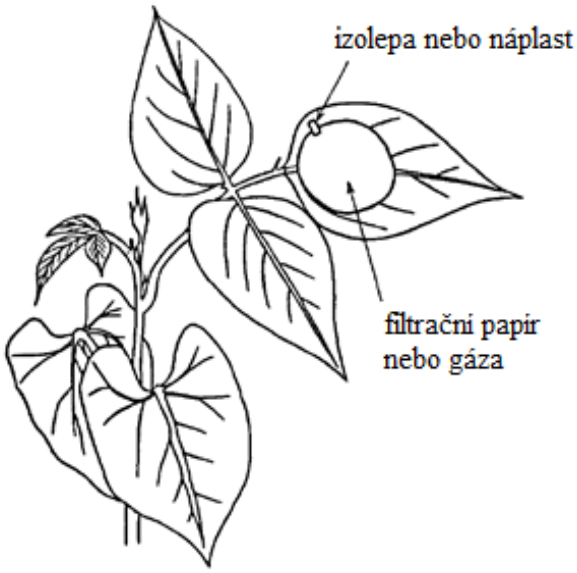


Obr. 24 Inhibiční zóny po 24 hodinách penetrace fungicidů adaxiální (U) a abaxiální (L) kutikulou [148].

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.

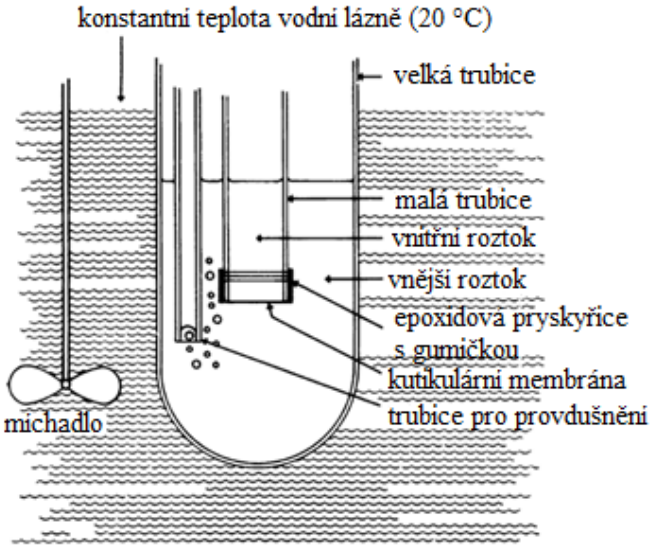
Foliárním příjmem živin se zabývali také *Okuda* s kolegy [149]. Ve své práci hodnotili vliv aplikovaných fosforečnanových sloučenin na listy a vliv pH na foliární příjem za využití metody radioaktivního značení. Okuda popisuje pět druhů metod příjmu živin rostlinou, jednou z nich je metoda máčení, kartáčování, sprejování, kapkování a v poslední řadě tzv. lepící metoda. Tato technika využívala filtračního papíru nebo gázy, na něž byly aplikovány fosforečnanové nebo fosforečnan-močovinové sloučeniny, které byly k povrchu listu fazole připevněny lepicí páskou (Obr. 25).

Z naměřených dat foliární absorpce zjistili, že příjem fosforečnanových sloučenin je výrazně ovlivněn přídavkem 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 přídavkem 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.



Obr. 25 Ilustrace lepicí metody (angl. *sticking method*) [149].

Penetrace iontů přes izolované rostlinné kutikuly studovali *Yamada* s kolegy [150]. V této práci vytvořili transportní aparaturu složenou z izolované rostlinné kutikuly, která sloužila jako přepážka rozdělující vnitřní a vnější komory difúzní aparatury (Obr. 26). Celý experiment spočíval v izolaci rostlinných kutikul, které získávali za využití Orgelovy izolační metody [135], která, jak již bylo zmíněno v kapitole 3.1.1, je založena na působení enzymů. Navíc, tuto metodu izolace modifikovali o další druh enzymů, kromě pektinázy využili rovněž enzymů celulázy a hemicelulázy, kde se inspirovali *Hinsvarkem* [151].



Obr. 26 Aparatura pro měření permeability iontů přes kutikulární membrány [150].

Yamada s kolegy [150] 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 [152] 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 [150], která je uvedena na obrázku (Obr. 26). 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.

Pro stanovení hodnot permeability působících látek na transkutikulární pohyb bylo využito rovnice (44):

$$\log_{10}(a - x) = \left(-\frac{k_1}{2{,}303}\right) t + \log_{10} a \qquad (44)$$

kde a je původní koncentrace vnitřního roztoku, x je koncentrace vnějšího roztoku v čase t a $(a–x)$ reprezentuje roztok zůstávající ve vnitřním roztoku v čase t. Rychlostní konstanta k_1 pro první řád reakce byla stanovena jako $k_1 = 2{,}303\ s^{-1}$. 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* [137], jak již bylo uvedeno výše (kap. 3.1.1). Pro studium penetrace se inspirovali Orgelovými metodami [135], 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 sacharínu. 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 µl. 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* [153]. 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 uhlíky (^{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:

$$\mathrm{P} = \frac{\mathrm{F}}{\mathrm{A}} \cdot (c_{\mathrm{don}} - c_{\mathrm{rec}}), \tag{45}$$

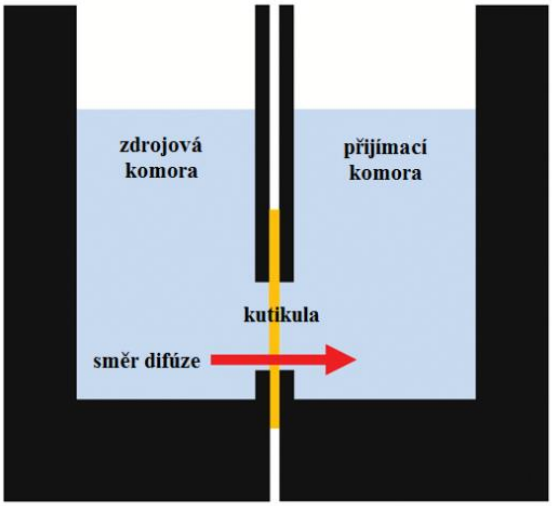
kde P je koeficient permeability v nm/s, F je tok v nmol/s, A je plocha kutikuly v kontaktu s roztokem v nm^2, c_{don} je koncentrace zdrojového roztoku a c_{rec} je koncentrace přijímacího roztoku v nmol/nm^3. Koeficient P určuje míru celkové propustnosti membrány. Z výstupů bylo zjištěno, že kutikuly 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* [154] 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 využilo 1mM roztoku azidu sodného, který byl přidán k roztoku ethoxylátu. Celý experiment byl založen na sledování změny koncentrace radioaktivně značených vodíků (^{3}H) v přijímací cele. Kompletní měření probíhalo po dobu 13 dnů. Pro stanovení koeficientu permeability P využili stejného matematického modelu jako v předešlé práci [153]. Z jejich experimentů bylo zjištěno, že rychlejšího transportu dosahují alkoholy oproti aminům.

Zeisler-Diehl a spol. [155] 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 μm. Kutikula byla poté upevněna mezi dvěma transportními komorami (Obr. 27), 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.

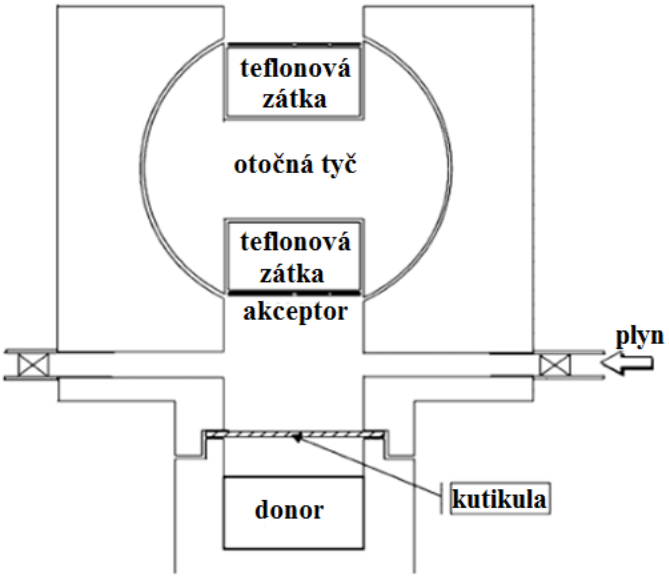
Tento experiment byl rovněž založen na sledování změny koncentrace radioaktivně značených sloučenin, kde pro detekci může být použita jednoduchá analytická nebo fotometrická metoda. Pro studium transpirace rostlinných kutikul je využíváno obdobných experimentálních uspořádání využívajících zdrojovou 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.



Obr. 27 Sestavení transportního zařízení pro studium transportu rozpuštěných plynů přes izolovanou rostlinou kutikulu [155].

Tématikou transpirace kutikul se zabýval i *Šantrůček* et al. [156], 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 měřící komoru, jejíž uspořádání je uvedeno na Obr. 28.



Obr. 28 Schéma komory používané pro měření difúze vypařování vody skrz porézní membránu v různých plynech. Donor reprezentuje radioaktivně značenou vodu $^{3}H_2O$ a akceptor je tvořen z papírového kruhu, který je nasycený vodou bez radioaktivního značení [156].

Abaxiální a adaxiální kutikuly byly izolovaly 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 $^{3}H_2O$ a přijímací (akceptor) obsahovala filtrační papír nasycený vodou. Koncentrační gradient $^{3}H_2O$ mezi zdrojovou a přijímací celou je určen hnací sílou difúze $^{3}H_2O$ přes membránu. Množství naakumulované radioaktivity v akceptoru v daných časech sloužil pro výpočet permeability vody.

3.3 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 (kap. 2.7 a 3.2), transport skrze horní a spodní kutikuly je značně odlišný, což je dáno jejich odlišnou strukturou [157], [158]. 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.

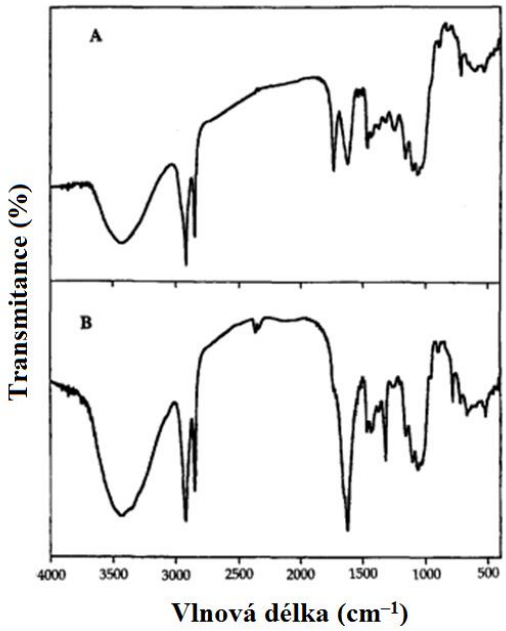
3.3.1 Interpretace FT-IR spekter rostlinných kutikul

Villena et al. [159] charakterizovali rostlinné kutikuly infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FT-IR). Pro realizaci analýzy bylo nutné kutikuly z listů klívie neboli řemenatky suříkové (lat. *Clivia miniata*) zbavit všech rozpustných polymerů, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků měření. V článku je popsáno využití FT-IR techniky pro stanovení funkčních skupin vyskytujících se v rostlinných kutikulách.

Prvním krokem procesu byla saponifikace roztokem chloroformu a metanolu v poměru 1:1 po dobu 4 hodin, a poté proběhla depolymerizace 1 hm. % roztokem hydroxidu draselného v metanolu po dobu 6 hodin. Část těchto kutikul byla využita pro měření FT-IR spekter, zbylá část byla opakovaně přečištěna, aby bylo docíleno úplného rozpuštění zbylých polymerů. Tyto kutikuly sloužily pro srovnání účinnosti jednoho cyklu depolymerizace vůči dvěma cyklům.

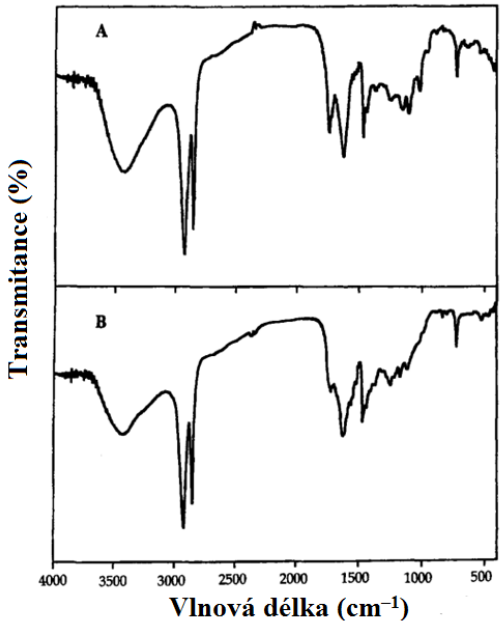
Kutikuly byly umístěny do plastové nádoby, která obsahovala 2–4 ml směsi pyridinu a kyseliny fluorovodíkové v poměru 1:1. Nádobka byla uzavřena a zahřáta na teplotu 40–45 °C po dobu 4 hodin. Poté následovalo odstranění polysacharidů a všech materiálů na bázi ligninu refluxací roztokem 0,1 mol/l HCl a dioxanu po dobu 5 hodin.

Pro FT-IR měření byly připraveny KBr tablety se vzorky kutikul. Na základě získaných spekter bylo možné stanovit, jaké složky a biopolymery jsou obsaženy v jakékoli kutikule. FT-IR spektrum (Obr. 29A) z izolovaných kutikul listů klívie znázorňují několik dominantních pásů [160], [161]. Široký pás při 3 420 cm^{-1} znázorňuje elastickou vibraci hydroxylových funkčních skupin, silný absorpční pás byl patrný rovněž u 1 732 cm^{-1}, který reprezentuje C–O elastickou vibraci karbonylové skupiny esterové vazby, což je vazba, která hydroxy a epoxy mastné kyseliny síťuje do formy kutinu [162]. Pás v oblasti 1 650–1 500 cm^{-1} popisuje fenolické sloučeniny [160], [163]. Dále je zde patrný pás v oblasti 1 470 cm^{-1}, který je typický pro deformace metylénu a na závěr zde byly detekovány absorpční pásy od 1 200–950 cm^{-1}, které představují různé C–O a O–H deformace sekundárních alkoholů. V oblasti „otisku prstu“ můžeme pozorovat pásy odpovídajícím struktuře celulózy [164].



Obr. 29 Znázornění FT-IR spekter pro rostlinné kutikuly. (A) Izolované kutikuly bez depolymerizace, (B) depolymerizované kutikuly směsí KOH a metanolu [159].

Infračervená spektra kutikul depolymerizovaných směsí KOH a metanolu (Obr. 29B) znázorňují mírné odlišnosti od předchozích spekter (Obr. 29A), což je zřejmé například na chybějícím dominantním píku v oblasti kolem 1 500 cm^{-1}, který znázorňuje především odstraněné fenolických skupin a hydroxymastných kyselin, které byly původně spojeny esterovou vazbou. Z dosavadních zjištění je možné usoudit, že kutikulární membrána je charakterizována dvěmi hlavními chemickými charakteristikami: alifatickými sloučeninami v oblasti 2 900 cm^{-1} (metylénová absorpce), aromatickými doménami representující polysacharidy v oblasti 1 600–1 700 cm^{-1}. Odstranění polysacharidů bylo umožněno refluxací v prostředí kyseliny fluorovodíkové [165].



Obr. 30 (A) FT-IR spektrum kutikuly z *Clicia miniata* po ošetření kyselinou fluorovodíkovou. (B) FT-IR spektrum zbylých kutikulárních materiálů [159].

Ze změřených FT-IR spekter je zřejmé (Obr. 30A), že „otisk prstu“ celulózy vymizel a spektra naopak poukazují na vznik nového absorpčního pásu při 1 740 cm^{-1} spolu se dvěma úzkými pásy při 1 167 a 1 113 cm^{-1}, které reprezentují asymetrickou a symetrickou elastickou vibraci C–O–C vazby.

Tento fakt naznačuje, že v prvním kroku přečištění kutikul nedošlo k úplnému odstranění esterových vazeb spojujících mastné kyseliny. Naopak ve spektru (Obr. 30B) můžeme vidět odstranění fenolických sloučenin, a navýšení spekter pro alifatické sloučeniny. Tyto alifatické biopolymery způsobily vznik píku při 1 633 cm^{-1} představující antisymetrickou elastickou vibraci COO^{-}, avšak okyselením vzorku došlo k dramatickému posunu k 1 730 cm^{-1}, která charakterizuje karbonylovou elastickou vibraci COOH funkčních skupin.

3.3.2 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. [166] 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.

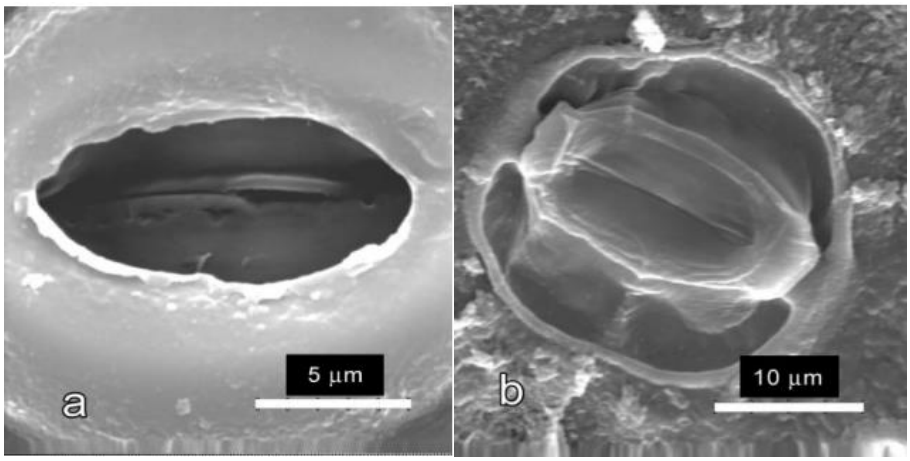
Rostlinné kutikuly disponují vnitřní fluorescenční emisí označovanou jako autofluorescence, která je způsobena přítomnými flavonoidy a kyselinou skořicovou. Flavonoidy jsou fenolické skupiny o nižší molekulové hmotnosti, které jsou rozdistribuované v rostlinném skeletu a hraji významnou roli při interakcích mezi rostlinou a okolním prostředím [167]. V kutinu jsou přítomny dva typy flavonoidů tzv. naringenin (tvoří 5–10 hm. %) a chalkonaringenin (tvoří 10–40 hm. %) [168], [169].

Nové mikroskopické techniky, jako je konfokální laserová skenovací mikroskopie, přinesly nové možnosti studia rostlinné tkáně díky přítomným fenolickým skupinám [170]. CLSM technika umožňuje vizualizaci chemikálií a makromolekulárních struktur užívajících speciálních fluorescenčních vlastností na základě jejich molekulárně absorpčního a emisního chování [171].

Schopnost CLSM tvořit 3D snímky je nesmírně důležitou vlastností pro studium rostlinné biologie. *Hutzler* et al. [172] uvádí, že tato technika umožňuje podávat informaci o subcelulárních fenolických sloučeninách. V tomto článku [166] 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.

3.3.3 Rastrovací elektronová mikroskopie rostlinných kutikul

Šantrůček et al. [156] 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 (Obr. 31). 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.



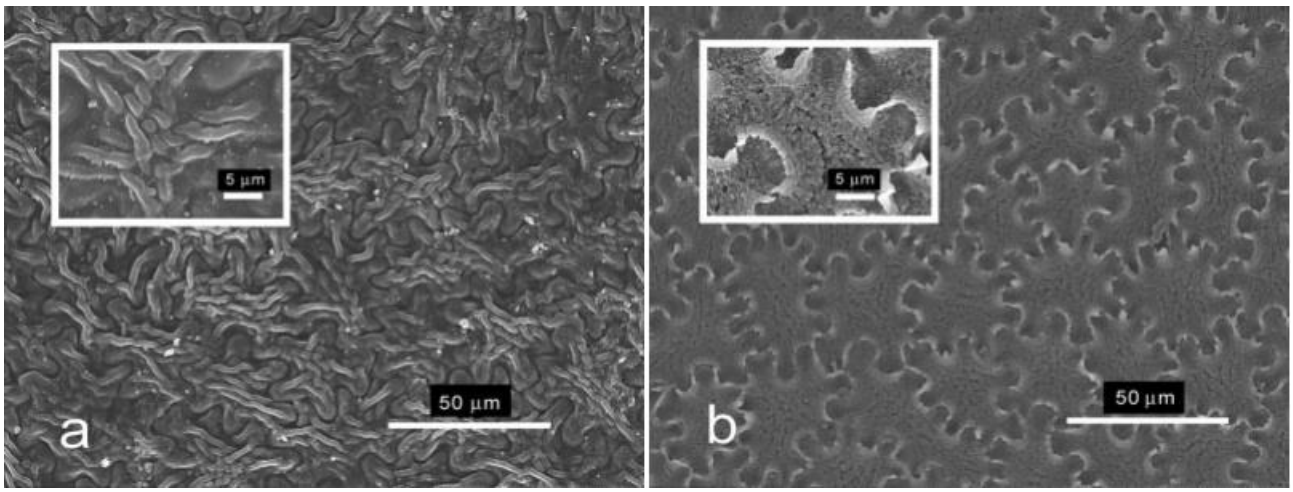
Obr. 31 Snímek abaxiálních stomat v kutikulární membráně izolované z listů *Herera helix*. (a) Póry z vnější strany kutikuly, (b) póry z vnitřní strany kutikuly [156].

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. 54), která vystihuje průměrné hodnoty naměřených velikostí šířek a délek hrdla pórů stomat.

Tab. 4 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 [156].

		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 mikroskopií byly studovány i horní kutikuly (Obr. 32), které neobsahují stomata, ale byly zde patrné praskliny, které mohou mít významný vliv v ovlivňování difúzních experimentů.



Obr. 32 Snímek astomatických kutikul z listu *Hedera helix*. Detekce kutikul z vnitřní strany kutikuly (a) a praskliny na kutikulách (b) [156].

3.4 Studium vlastností agarózových hydrogelů

Studium transportních vlastností aplikovaných přípravků přes rostlinné kutikuly byly realizovány agarózovými hydrogely coby nosnými matricemi. Vzhledem k tomu, že se jedná o stěžejní materiál, bylo nutné provést jeho základní charakterizace, jako je zobrazení struktury gelu rastrovací elektronovou mikroskopií, zjištění velikosti pórů rtuťovou porozimetrií či stanovení mechanických vlastností reometrií. Aby bylo možné tyto charakterizace agarózových hydrogelů provést, bylo nutné nastudovat vědecké publikace zabývající se tímto tématem.

3.4.1 Studium porozity hydrogelových systémů

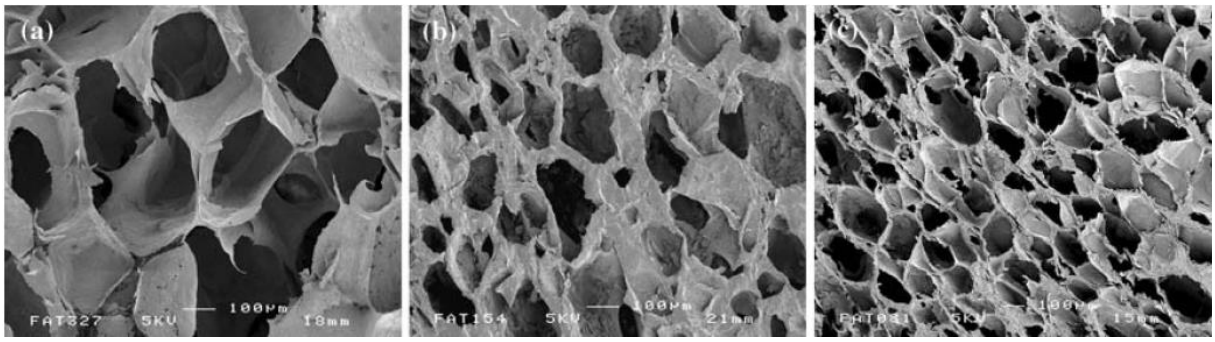
Pro zjištění a kontrolu porézních struktur hydrogelů a jejich dalších vlastností se velmi často využívá rtuťové porozimetrie (angl. *mercury intrusion porozimetry* – MIP) doprovázené rastrovací elektronovou mikroskopií (angl. *scanning electron microscopy* – SEM). MIP metoda je vhodná pro stanovení parametrů materiálů, jako je velikost struktur uvnitř studovaného materiálu (póry, trubičky, dutiny aj.). SEM naopak umožňuje zobrazení vnitřní struktury vysušeného gelu a stanovení procentuálního množství prvků zastoupených v tomto materiálu. Díky výše zmíněným metodám je možné stanovit důležité parametry studovaného materiálu a využití těchto znalostí pro vytvoření či úpravu nových materiálů, které budou mít lepší využití v praxi či povedou k vývoji inovativních materiálů.

Partap et al. [173] se zabývali přípravou a charakterizací porézních alginátových hydrogelů. Jejich porézní materiály byly syntetizovány tzv. micelárním uspořádáním (angl. *micelle templating* – MT) a následnou vnitřní gelací. Vzniklá porézní mikrostruktura byla měřena na rtuťovém porozimetru, na rastrovacím elektronovém mikroskopu a dalších technikách. Tyto porézní hydrogely se staly vhodnými materiály pro oblast tkáňového inženýrství (angl. *scaffolds*).

Alginát patří mezi atraktivní přírodní biomateriály, které se vyznačují svojí kompatibilitou, nízkou toxicitou a schopností gelace s kovovými kationty. Partapova práce se zabývá přípravou hydrogelů procesem zvaným samovolné spojování (angl. *self-assembly*), kterým dochází ke vzniku struktur s kontrolovanou velikostí pórů, které jsou svými vlastnostmi vhodné pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Tyto vysoce porézní struktury se podílejí na migraci buněk nebo řízeném dodávání nutričních látek.

V první řadě byly alginátové hydrogely analyzovány na rastrovacím elektronovém mikroskopu. Nejdříve byl vzorek lyofilizován v prostředí kapalného dusíku po dobu 5 minut. Tyto xerogely byly rozřezány na malé fragmenty, a poté byly upevněny na hliníkový čep černou karbonovou páskou. Vzorky byly před analýzou potaženy zlatem a následně byly analyzovány na SEM [173]. Dále byly vzorky proměřeny na rtuťové porozimetrii. Tyto experimenty probíhaly při nízkých tlacích (0–45 PSI), které umožnily získat distribuce pórů, které se pohybovaly v rozmezí 1–360 μm [173].

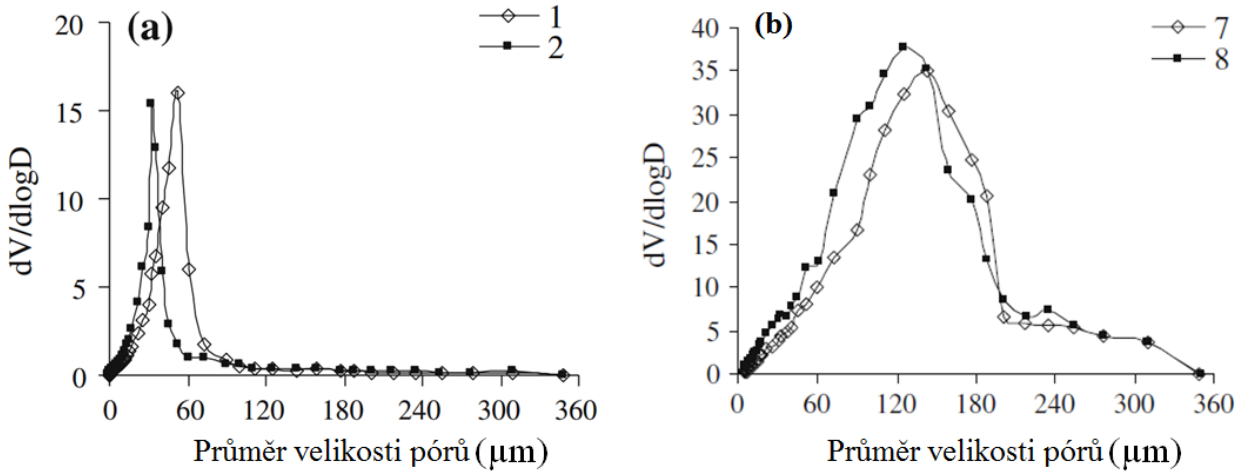
SEM a MIP byly využity pro objasnění mikrostruktury xerogelu vzniklé syntézou micelárního uspořádání. SEM snímky ukazují, že póry vzorků, které byly připravené pomocí MT metody, jsou poměrně jednotné jak svým tvarem, tak velikostí a jsou zorganizovány uspořádaným způsobem. Snímky zobrazují, že tyto vzorky obsahovaly protáhlé struktury pórů (Obr. 33). Dále je z fotografií patrné, jak se se zvyšující koncentrací aktivní látky zmenšují a uzavírají póry.



Obr. 33 Snímky hydrogelů připravovaných micelárním uspořádáním s různým obsahem koncentrace CTAB. (a) 0,04 M, (b) 0,2 M (c) 0,3 M [173].

MIP metoda ukazuje, že hydrogely připravené tímto způsobem vedou ke vzniku vysoce porézních struktur, jejichž stupeň poréznosti dosahoval 83–97 obj. %. Tyto hydrogely měly relativně monodisperzní rozdělení pórů, s velikostí pórů v rozmezí 32,5–164,0 μm a s vysokým celkovým objemem pórů dosahujícího hodnot 4,5–20,3 cm^3/g.

Distribuce velikosti pórů byla stanovena pro MT hydrogely, které byly připraveny z 0,01M cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB). Nízkou koncentrací povrchově aktivní látky docházelo ke vzniku otevřených, vnitřně propojených a mírně protáhlých pórů s vysokým totálním objemem a většími velikostmi pórů, což je patrné z grafu (Obr. 34b). Naopak vzorky, které byly připravovány z CTAB o koncentraci 0,3M, se vyznačovaly porézní sítí s uzavřenými a menšími póry s užší distribucí velikostí pórů (Obr. 34a). Při těchto studiích byly stanoveny distribuce velikosti pórů pro vzorky připravované při 35 a 50 °C.

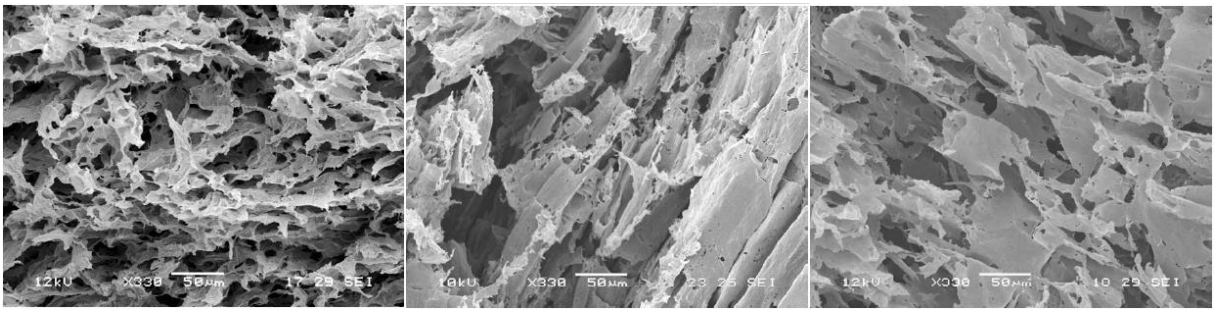


Obr. 34 Data z MIP pro hydrogely připravované micelárním uspořádáním a vnitřní gelací za použití (a) 0,3M a (b) 0,01M CTAB [173].

Cascone et al. [174] se také zabývali hydrogely, které by mohly sloužit jako scaffolds (lešení) pro tkáňové inženýrství. Jedná se o materiály na bázi polyvinylalkoholu (PVA), které mají biokompatibilní a biodegradabilní vlastnosti. Porozita těchto hydrogelů byla charakterizována prostřednictvím skenovací elektronové mikroskopie a rtuťové porozimetrie, díky níž byla stanovena distribuce velikosti pórů.

Připravené PVA hydrogely byly analyzovány SEM. Vzorky byly nejdříve lyofilizovány, poté umístěny do hliníkové trubičky a před samotnou analýzou byl jejich povrch potažen zlatem. Také rtuťová porozimetrie byla provedena na lyofilizovaných vzorcích hydrogelů, kde průměr pórů byl stanoven v rozmezí 0,007–120 μm.

Výsledkem analýzy provedeného pomocí SEM byly snímky, které zaznamenaly strukturu čistých PVA hydrogelů a PVA materiálů s obsahem příměsí kyseliny hyaluronové, dextranu apod. Snímky znázorňují nepravidelné struktury pórů (Obr. 35).



Obr. 35 Snímky struktury PVA hydrogelů a jejich modifikací [174].

U těchto vzorků byla dále provedena analýza velikosti pórů, čímž byla získána distribuce objemů pórů, a to pro čistý PVA hydrogel a dextran/PVA hydrogel.

4 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*).
- ✓ difúzní experimenty studované v závislosti na teplotě.
- ✓ sestavení vhodného matematického modelu popisujícího difúzi přes rostlinné kutikuly
- ✓ 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.
- ✓ 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).
- ✓ 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.
- ✓ stanovení základních fyzikálně-chemických vlastností půd (pH a elektrická vodivost).
- ✓ stanovení množství dusíku v půdě ve formě $[NH_4^+]$–N a $[NO_3^-]$–N.
- ✓ realizace inkubačních testů a stanovení množství oxidu uhličitého a oxidu dusného v půdách.

- ✓ stanovení pH, elektrické vodivosti a množství dusíku vázaného na minerální formy [NH_4^+]–N a [NO_3^-]–N.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST I

5.1 Použité chemikálie

5.1.1 Enzymatická metoda izolace rostlinných kutikul

Chemikálie	čistota	výrobce
kyselina citronová	99,5%	Sigma-Aldrich
citrát sodný	99,5%	Sigma-Aldrich
pektináza	p.a.	Sigma-Aldrich
celuláza	p.a.	Sigma-Aldrich
azid sodný	p.a.	Sigma-Aldrich

5.1.2 Enzymatická metoda izolace rostlinný kutikul

Chemikálie	čistota	výrobce
chlorid zinečnatý	97,0%	Sigma-Aldrich
kyselina chlorovodíková	99,0%	Sigma-Aldrich

5.1.3 Příprava agarózových hydrogelů

Chemikálie	čistota	výrobce
agaróza	p.a.	Sigma-Aldrich
Lignohumát A		Amagro, s.r.o.

5.2 Použité přístroje

5.2.1 Charakterizace rostlinných kutikul

Měřící technika	**TYP**
optický mikroskop	Olympus IX71
optický mikroskop	Nikon Eclipc C*i*
emisní lampa	X-Cite Series 120 Q
mikroskopie doby života fluorescence	MicroTime 200, PicoQuant
mechanický profilometr	DEKTA kXT, Bruker
rastrovací elektronový mikroskop	ZEISS EVO LS 10
isotermální mikrokalorimetrie	TAM II, TA Instruments, Inc.

5.2.2 Charakterizace hydrogelových materiálů

Měřící technika	**Typ**
reometr	AR-G2, TA Instruments, Inc.
termostat	Haake DC5
lyofilizátor	Vir Tis, Benchtop K
rtuťový porozimetr	Poromaster 60, Quantachrome
rastrovací elektronový mikroskop	ZEISS EVO LS 10

5.2.3 Měření difúzních experimentů

Měřící technika	**Typ**
UV-VIS spektrometr	Cary 50, Varian

5.2.4 Difúzní experimenty přes syntetické membrány

Měřící technika	**Typ**
Nuclepore Track-Etch Membrane (47 mm, 10 μm)	Whatman

5.3 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. Jak již bylo uvedeno výše (kap. 2.6 a 3.2), 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.

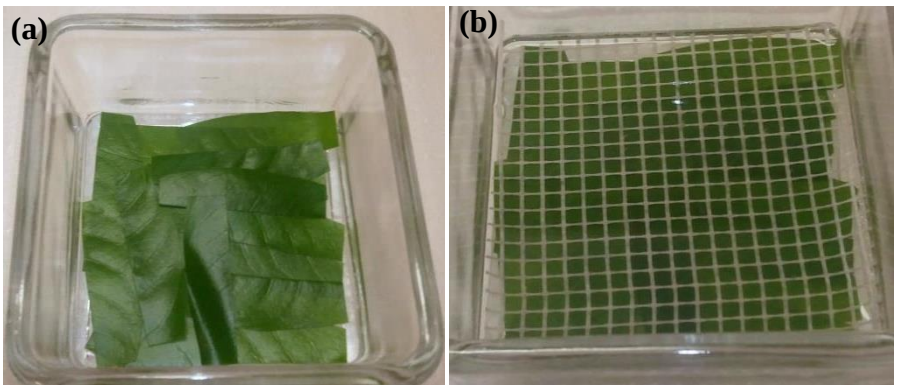
Obr. 36 Okrasná dřevina bobkovišeň lékařská (lat. *Prunus laurocerasus*).

Na základě dosavadních zkušeností nabytých z publikací [175] a [176] byly zvoleny kutikuly z listů bobkovišně lékařské (Obr. 36). Její kutikuly jsou pevné, snadno se s nimi manipuluje při přípravě difúzních experimentů, a při samotném měření.

5.3.1 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* [135].

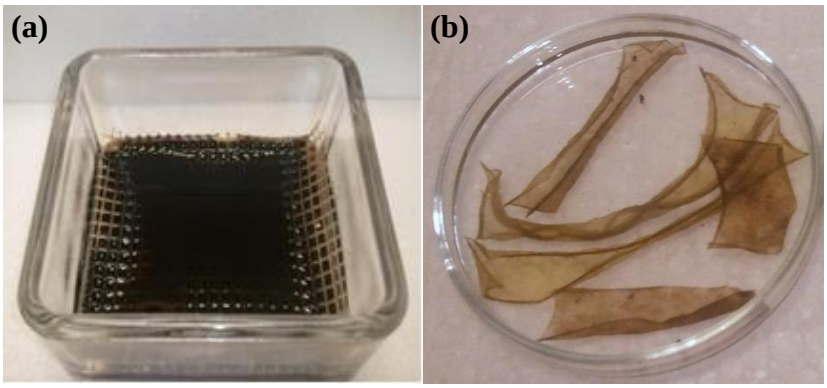
Listy bobkovišně lékařské byly ponořeny do čisté vody, aby došlo k očištění jejich povrchu. Poté byly listy zbaveny řapíku, okrajových částí listu, případně i mechanicky poškozených částí (Obr. 37a). Tím bylo dosaženo bezproblémové separace kutikuly od mezofylu listu v závěrečném kroku izolace. Listy byly vloženy do skleněné nádoby, kde byly uchyceny plastovou mřížkou (Obr. 37b), aby nedošlo k jejich vyplavení na hladinu a celý jejich povrch byl v kontaktu s izolačním roztokem.



Obr. 37 Příprava listů pro izolaci (a), uchycení listů umělohmotnou mřížkou (b).

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

Izolace kutikul probíhala po dobu 3 dnů (Obr. 38a), po této době byly kutikuly vneseny do Petriho misek s čistou destilovanou vodou a pomocí štětce byly odstraněny zbylé nečistoty (Obr. 38b). Kutikuly byly několikrát promyty v destilované vodě pro odstranění zbytkových nečistot.



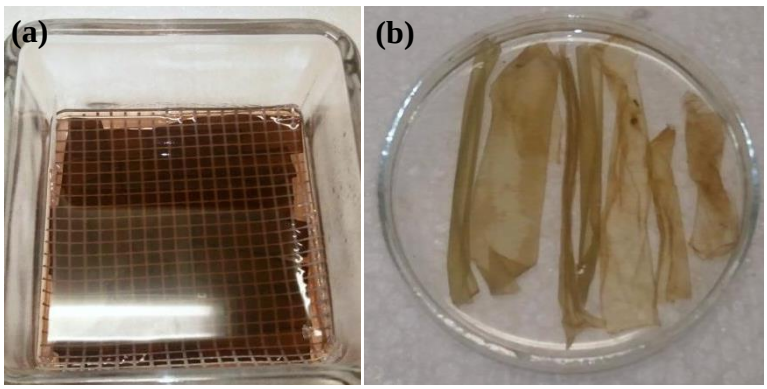
Obr. 38 Nádoba s izolačním roztokem a listy pro chemicky izolované kutikuly po 3 dnech působení (a), separace kutikul z listů a jejich očištění (b).

5.3.2 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, celuláza 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 5.3.1 (Obr. 37). 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 (Obr. 39a). Poté byly kutikuly mechanicky odstraněny pomocí pinzety a štětce (Obr. 39b). Ve výsledku byly získány transparentní tenké membrány, které byly několikrát promyty v čisté destilované vodě.



Obr. 39 Nádoba s izolačním roztokem pro enzymaticky izolované kutikuly po 6 týdnech (a), separace kutikul z listů a jejich očištění (b).

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 temperanční 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 [93].

5.4 Charakterizace rostlinných kutikul

Izolace rostlinných kutikul probíhala dvěma odlišnými metodami (chemicky a enzymaticky), o čemž pojednává kapitola 5.3. Z dostupných materiálů [92]–[95] 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. Dále byly kutikuly charakterizovány mechanickou profilometrií či infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací.

5.4.1 Příprava vzorků pro optickou mikroskopii a fluorescenční 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 mokrém 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) (Příloha 1) 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.

Obr. 40 Vzorky kutikul umístěných na podložních sklíčkách pro měření optické a fluorescenční mikroskopie.

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 (Obr. 40). Důležité bylo, aby kutikuly neobsahovaly žádné vzduchové bubliny, které by mohly zkreslit nebo úplně znemožnit mikroskopické pozorování. Poté, co byly vzorky důkladně prozkoumány a nasnímány, byly stejné vzorky využity i pro charakterizaci fluorescenční mikroskopií (Olympus IX s excitační lampou X-Cite Series 120Q Lumen Dynamic) (Příloha 1). Touto metodou bylo možné zjistit více o auto-fluorescenci rostlinných kutikul. Ta je rovněž velmi důležitá, neboť fluorescenční děje můžou ovlivňovat některé další techniky měření nebo je možné je využít pro další charakterizace kutikul. Pro měření autofluorescence kutikul bylo využito pět různých filtrů o vlnových délkách 365, 405, 470, 530 a 552 nm. Pro zobrazení vzorků byl použit objektiv s 60násobným zvětšením.

5.4.2 Příprava vzorků pro mikroskopii doby života fluorescence (FLIM)

Pro studium dob života fluorescence molekul obsažených v kutikulách a jejich chování ve třech různých prostředích (voda, vzduch a lignohumát draselný) v závislosti na čase bylo využito přístroje mikroskopie měření doby života fluorescence FLIM typu MicroTime 2000 od firmy Pico

Quant, která je spojena s optickým mikroskopem Olympus IX (Příloha 1). Tato technika umožňuje pozorovat dobu života fluorescence fluorescenční sondy, respektive v našem případě auto-fluorescenci molekul přítomných v kutikulách. Kutikuly obsahují kromě kutinu, kutanu a extracelulárních vosků také flavonoidy, které se vyznačují svou schopností fluoreskovat [167]–[169]. Díky těmto skupinám bylo možné studovat chování kutikul v různých prostředích a vliv působení lignohumátu draselného.

Pro měření bylo využito speciální optiky upravené pro mokrá prostředí, aby docházelo k dobré fokusaci vzorku a zároveň nedocházelo k jeho zničení při působení laseru. Pro měření byla použita optika s 60násobným zvětšením a inverzním prostředím byla zvolena voda. Pro měření byl využit laser o vlnové délce 470 nm a směr paprsků laseru byl v horizontální poloze.

Vzorky izolovaných kutikul byly po rozřazení na abaxiální a adaxiální stranu nařezány na čtverce velikosti 2×2 cm, pro vzorky zkoumané na vzduchu byly kutikuly dobře rozprostřeny na krycí mikroskopická sklíčka a ponechány k jejich vysušení za laboratorní teploty, poté byly dány do uzavíratelné nádobky, aby bylo zamezeno možnému znečištění vzorků.

Pro další typ vzorků bylo využito rovněž plastových nádob, do nichž byla umístěna kutikula s destilovanou vodou, respektive s lignohumátem draselným. Vzhledem k vysoké citlivosti přístroje bylo využito vodného roztoku lignohumátu draselného o koncentraci 0,01 hm. %. Měření auto-fluorescence rostlinných kutikul probíhalo po dobu 14 dní. Celkem bylo připraveno 5 vzorků od každého typu kutikuly, přehled vzorků je uveden v tabulce (Tab. 5).

Tab. 5 Přehled připravených vzorků pro měření dob života fluorescence přístrojem FLIM.

	Prostředí		
	voda	**Vzduch**	**lignohumát draselný**
Typ vzorku	EIK – abaxiální	EIK – abaxiální	EIK – abaxiální
	EIK – adaxiální	EIK – adaxiální	EIK – adaxiální
	CHIK – abaxiální	CHIK – abaxiální	CHIK – abaxiální
	CHIK – adaxiální	CHIK – adaxiální	CHIK – adaxiální

5.4.3 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 štetcem 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

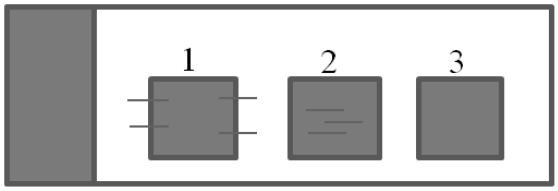
byly následující: proud odpovídal 80 pA, napětí 10 kV a pracovní vzdálenost 9 mm. Snímky byly pořízeny na základě sekundárně odražených elektronů.

5.4.4 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 nanesena na podložní mikrosklíčko tak, aby byla dokonale napnutá a nedošlo k vytvoření vzduchových bublin. Na jedno mikrosklíčko byly naneseny 3 kutikuly stejného typu, které byly následně vysušeny za laboratorní teploty.

Na schématu (Obr. 41) je možné vidět uspořádání vzorků kutikul na mikroskopickém sklíčku. Rovněž jsou zde znázorněny červené čáry, které v prvním případě zachycují místa, kde byla kutikulám proměřována tloušťka vrstvy (vzorek 1), naopak na vzorku 2 jsou znázorněny čáry zachycující místa měření profilu kutikul, tedy jejich nehomogenita. Tato dvě měření byla provedena u všech tří vzorků a výsledné hodnoty byly způměrovány. 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.



Obr. 41 Schéma podložního sklíčka a vzorků kutikul. Červené čáry znázorňují měřící místa pro tloušťku kutikul (vzorek 1) a pro měření profilů (vzorek 2).

5.4.5 Isotermální mikrokalorimetrie (IMC)

Metoda isotermální kalorimetrie je součástí přístroje modulární mikrokalorimetrie (Příloha 3), která umožňuje stanovit tepelné zabarvení chemických reakcí a poskytuje informace o těchto procesech. IMC technika byla využita pro měření interakcí kutikul s lignohumátem draselným. Tato měření probíhala v uzavřených systémech, skleněných ampulích, do kterých byla umístěna kutikula, která byla zakápnuta studovaným roztokem.

Experimenty probíhaly pro adaxiální a abaxiální kutikuly chemicky i enzymaticky izolované, pro roztok lignohumátu A o koncentraci 0,1; 0,5 a 0,01 hm. % a pro vodu s azidem sodným. Měnícím parametrem experimentu byla teplota, vzorky byly měřeny při teplotě 25 a 35 °C. Měření probíhalo v řádech týdnů až měsíce.

5.4.6 Měření kontaktního úhlu povrchu rostlinných kutikul

Pro měření kontaktního úhlu byl využit přístroj Contact Angle System OCA (Příloha 4). Tento přístroj slouží pro měření kontaktního úhlu kapky roztoku nadávkovaného na povrch studovaného materiálu, z velikosti kontaktního úhlu je možné usuzovat na povahu povrchu materiálu. Pro měření byly využity všechny typy zkoumaných kutikul, tedy chemicky a enzymaticky izolované a jejich adaxiální a abaxiání strany. Kutikuly byly štetcem naneseny na podložní sklíčka a byly ponechány k vyschnutí při laboratorní teplotě.

Na povrch rostlinných kutikul byly aplikovány roztoky voda a 1 hm. % lignohumát draselný. Roztok byl kápnut na povrch rostlinné kutikuly a pomocí progamu SCA20 byly změřeny a vypočteny kontaktní úhly kapky (Obr. 42). Z nich bylo možné určit, jakou má povrch smáčivost a zdali komerční přípravek, lignohumát A, výrazně mění smáčecí vlastnosti.

Obr. 42 Proložení kapky křivkami a výpočet kontaktních úhlů.

5.5 Příprava agarózových hydrogelů

Agarózové hydrogely byly využity pro přípravu nosných matric pro studium difúzních experimentů. Agaróza je biopolymer s termoreverzibilními vlastnostmi (kap. 2.3), díky jeho jednoduché přípravě a jeho vlastnostem se stal skvělým adeptem pro realizaci difúzních experimentů. Na základě dosavadních zkušeností a dosažených experimentů, které budou simulovat vodné prostředí, bylo využito hydrogelů s obsahem 1 hm. % agarózy a 99 hm. % vody.

Difúzní experimenty byly založeny na dvou typech hydrogelů, přijímacím hydrogelu a zdrojovém hydrogelu. Přijímací hydrogel obsahuje pouze vodu a síťovací činidlo, kdežto zdrojový hydrogel obsahuje navíc 1 hm. % lignohumát draselný (kap. 5.1.3).

Přijímací 1 hm. % agarózový hydrogel je připraven zahřátím roztoku (vody s rozdispergovanou agarózou) na teplotu 80–85 °C, čímž dojde k rozpuštění pevného biopolymeru a dojde k rozpletení jeho dlouhých řetězců ve vodném prostředí. Vodný roztok biopolymeru byl nalit do plastových polymethylmethakrylátových (PMMA) kyvet a byl ponechán ke ztuhnutí, neboť při teplotách nižších než 40 °C, dochází k vytvoření trojrozměrné (3D) sítě, která prostupuje celým objemem vzorku a vytváří tak polotuhý gelový materiál.

Obdobným způsobem bylo postupováno i v případě přípravy zdrojových hydrogelových matric. Nejdříve bylo nutné připravit 1 hm. % vodný roztok LH, který byl využit pro přípravu hydrogelů. I v tomto případě bylo nutné vodný roztok s agarózou zahřát, vlít do plastových kyvet a poté ponechat ke zchladnutí do dosažení laboratorní teploty. Takto připravené hydrogely byly využity pro přípravu difúzních experimentů a také pro jejich charakterizaci.

5.6 Charakterizace agarózových hydrogelů

Agarózové hydrogely byly podrobeny několika měřením například na rastrovacím elektronovém mikroskopu, rtuťové porozimetrii či reometru. Díky těmto metodám bylo možné určit jejich vlastnosti, jako jsou mechanické vlastnosti hydrogelů, zkoumat jejich strukturu a povrch. Na závěr bylo možné porovnat rozdíly mezi přijímacím a zdrojovým hydrogelem.

5.6.1 Rtuťová porozimetrie

Rtuťová porozimetrie je založena na principu vtlačování rtuti pod tlakem do pórů vzorku. Přístroj umožňuje měřit velikost pórů, totální objem pórů, zdánlivou hustotu nebo specifický povrch plochy vzorku. Vzorky hydrogelů byly měřeny na přístroji PoroMaster 60 od firmy Quantachrome (Příloha 5). Přístroj je schopný měřit velikost vnějších pórů, avšak rtuť není vtlačena do vnitřních pórů a dutin materiálu. Rtuťová porozimetrie umožňuje měřit velikosti pórů v rozmezí 500 µm až 3,5 nm.

Pro měření velikosti pórů v agarózových hydrogelech bylo nutné hydrogely lyofilizovat lyofilizátorem (Vir Tis benchtop K), čímž byl získán vysušený gel připomínající tuhou pěnu (Obr. 43). Nastavení přístroje odpovídalo následujícím parametrům: rozmezí tlaků bylo nastaveno mezi 0,2–50 PSI. Výstupem z měření byly distribuční křivky velikosti pórů v hydrogelech.

Obr. 43 Lyofilizované vzorky agarózových hydrogelů. Vysušený zdrojový hydrogel s obsahem 1 hm. % agarózy a 1 hm. % LH (vlevo) a vysušený přijímací hydrogel obsahující 1 hm. % agarózový gel (vpravo).

5.6.2 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

Pro rastrovací elektronovou mikroskopii byly vzorky připraveny následujícím způsobem. Vzorky byly připraveny do lyofilizačních nádob o objemu 0,2 dm^3. Gely byly ponechány k vychladnutí přes noc, aby bylo docíleno dokonalého zesíťování struktury hydrogelu, přitom bylo dbáno na to, aby nedošlo k vyschnutí jejich povrchu, proto vzorky musely být dobře utěsněny. Následně byly nádobky vymraženy na vakuové odparce a byly dány před vyvakuováním lyofilizátoru do mrazničky.

Lyofilizátor (Vir Tis, benchtop K) byl nastaven a vymražen na teplotu –105 °C a tlak odpovídal 624 µbar, vzorky byly lyofilizovány po dobu 4 dnů. Po získání tuhé pěny zdrojového a přijímacího hydrogelu, byly vzorky proměřeny pomocí SEM (ZEISS EVO LS 10) (Příloha 6). Elektronovou mikroskopií bylo možné určit, jak vypadá vnitřní struktura hydrogelů a jak se odlišují povrchy těchto gelů. Rovněž byla stanovena velikost pórů v hydrogelových matricích, které byly porovnány s ostatními metodami stanovujícími velikost pórů.

Na mosazné držáky byly nalepeny uhlíkové černé pásky, díky nimž bylo možné xerogely uchytit a poté pozlatit. Parametry nastavení byly následující: proud odpovídal 80 pA, napětí 10 kV a pracovní vzdálenost 9 mm. Snímky byly pořízeny na základě sekundárně odražených elektronů.

5.6.3 Reologie agarózových hydrogelů

Mechanické vlastnosti hydrogelů byly měřeny na přístroji Reometr AR-G2 od společnosti TA Instruments, Inc. (Příloha 7). Při měření mechanických vlastností hydrogelů není zapotřebí upravovat složení či povahu vzorku. Hydrogely tedy byly připraveny dle popisu uvedeného v kapitole 5.6, jen byly vlity do Petriho misek o průměrech 5 cm, kde byly ponechány ke ztuhnutí po 24 hodin. Tím vznikla kontinuální 3D síť v celém studovaném vzorku.

Po této době byly vzorky proměřeny na reometru, byly zvoleny jednoduché oscilační testy, frekvenční testy (angl. *Frequency sweep*) a deformační testy (angl. *Strain sweep*). Pro oba testy byla využita geometrie deska-deska. Pro deformační test platí, že amplituda deformace se mění a frekvence oscilací zůstává konstantní, kdežto pro frekvenční test platí, že amplituda deformace je konstantní a mění se frekvence oscilací.

Deformační testy byly měřeny za následujícího nastavení přístroje: amplituda deformace byla měněna v rozsahu 0,01–200 % a hodnota frekvence oscilace odpovídala 1 Hz. Na základě tohoto měření bylo možné provést nastavení frekvenčního testu, pro něhož platily tyto podmínky: rozsah frekvence oscilací byl v rozmezí 20–0,01 Hz a amplituda deformace odpovídala konstantní hodnotě 0,1 %, která byla zjištěna z deformačních testů. Tyto experimenty byly realizovány při teplotě 25 °C, která byla udržována na konstantní hodnotě, pomocí průtokového termostatu Haake DC5.

Měření vzorků bylo realizováno následujícím způsobem. Vzorek byl nadávkován na stacionární měřící desku, poté byl přitlačen pohyblivou deskou tak, aby mezera mezi oběma deskami byla přesně 1 000 μm. Maximální normálová síla, která byla na vzorek vyvinuta během stlačování, odpovídala 5 N. Po stlačení hydrogelu senzorem, byl vzorek ponechán k relaxaci po dobu 5 minut při konstantní teplotě 25 °C. Po této době bylo spuštěno měření. Vzorky byly podrobeny nejdříve deformačním testům a poté frekvenčním testům.

5.7 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 hydrogelem (kap. 5.5) a rostlinných kutikul izolovaných z listů *Prunus laurocerasus* (kap. 5.3).

5.7.1 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 (Příloha 8). Pro měření byl využit speciální posuvný nástavec na kyvety (Příloha 8), 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.

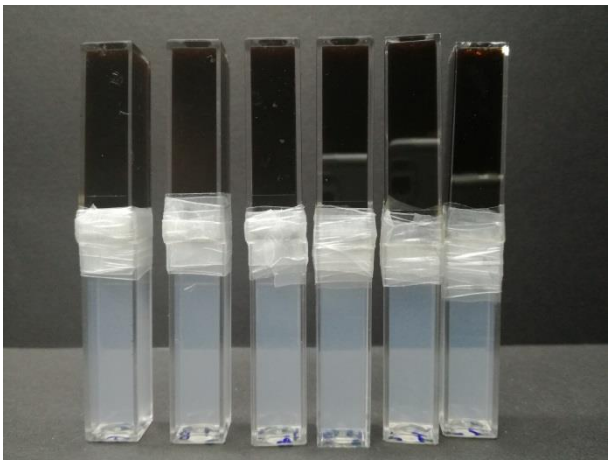
5.7.2 Difúze ze zdrojového hydrogelu

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. Jejich přípravě byla věnována celá kapitola 5.5.

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. 44) 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.

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.



Obr. 44 Ukázka přípravy difúzního páru.

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST II

6.1 Použité chemikálie

6.1.1 Příprava skleníkových experimentů

Chemikálie	obsah prvků v produktu	výrobce
Super Phosphate	9,1 % P, 11,5 % S a 20 % C	Richgro Garden Products
urea	46 % N	Richgro Garden Products
Sulphate of Potash	41,5 % K_2SO_4, 17 % S	Richgro Garden Products
superabsorbent I	1,2 % NPK, 1,8 % LH	FCH VUT v Brně
superabsorbent II	1,2 % NPK	FCH VUT v Brně
Lignohumát A		Amagro s.r.o.
půda z oblasti Cranbourne (Austrálie)		Monash University

6.1.2 Příprava inkubačních testů

Chemikálie	obsah prvků v produktu	výrobce
super fosfát	9,1 % P, 11,5 % S a 20 % C	Richgro Garden Products
močovina	46 % N	Richgro Garden Products
síran draselný	41,5 % K_2SO_4, 17 % S	Richgro Garden Products
superabsorbent I	1,2 % NPK, 1,8 % LH	FCH VUT v Brně
superabsorbent II	1,2 % NPK	FCH VUT v Brně
Lignohumát A		Amagro s.r.o.
půda z oblasti Cranbourne (Austrálie)		Monash University

6.1.3 Extrakce půdy

Chemikálie	čistota	výrobce
chlorid draselný	≥ 99,0%	Sigma-Aldrich

6.1.4 Stanovení dusíku v půdě v podobě $NH_4^+ - N$

Chemikálie	čistota	výrobce
salicylát sodný	99%	Sigma-Aldrich
citrát sodný dihydrát	≥ 99,0%	Sigma-Aldrich
tartrát (vínan) sodný dihydrát	≥ 99,0%	Sigma-Aldrich
nitroprusside sodný	p.a.	Sigma-Aldrich
hydroxid sodný	≥ 98,0%	Sigma-Aldrich
bělidlo (hypochlorid sodný)	12,5 %	Bleach, Great Value
bělidlo (hypochlorid sodný)	12,0 %	Clorox

$NH_4^+ - N$ standard[1]	p.a.	Sigma-Aldrich

6.1.5 Stanovení dusíku v půdě v podobě $NO_3^- - N$

Chemikálie	čistota	výrobce
chlorid vanaditý	> 99,0%	Merck
kyselina chlorovodíková	37%	Sigma-Aldrich
sulfanilamid	≥ 99,0%	Sigma-Aldrich
NED[2]	≥ 98,0%	Sigma-Aldrich
$NO_3^- - N$[3] standard	p.a.	Sigma-Aldrich

6.1.6 Stanovení fosforu v půdě tzv. Colwell P

Chemikálie	čistota	výrobce
hydrogenuhličitan sodný	> 99,0%	Merck
hydroxid sodný	≥ 98,0%	Sigma-Aldrich
kyselina sírová	≥ 98,0%	Sigma-Aldrich
molybdenan amonný tetrahydrát	≥ 99%	Sigma-Aldrich
vínan draselno-antimonitého hydrát	≥ 99%	Sigma-Aldrich
L-askorbová kyselina	p.a.	Sigma-Aldrich
KH_2PO_4 standard[4]	p.a.	Sigma-Aldrich

[1] Ammonium nitrite standard
[2] N-(1-naphtyl)ethylenediamine dihydrochloride)
[3] Nitrite nitrogen standard
[4] Potassium phosphate monobasic standard

6.2 Použité přístroje

6.2.1 Skleníkové experimenty

Měřící technika	Typ
UV-VIS spektrometr	Thermo Fischer Science, Multiscan Go

6.2.2 Příprava půdních vzorků

Pomocná technika	Typ
odstředivka	Termo Fischer Science, SL 8

6.2.3 Inkubační testy

Měřící technika	Typ
plynová chromatografie	Agilent Technologies, model 6890

6.3 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 Univerversity, 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.

6.3.1 Příprava vzorků pro skleníkové experimenty

Skleníkové experimenty probíhaly na pozemcích Monash University, přesněji probíhaly ve skleníkovém areálu (Obr. 45). Zde se nacházely retenční nádrže pro vodu, solární panely pro výrobu elektřiny či dřevěné boxy, v nichž se nacházely různé typy půd, které byly pro skleníkové experimenty pravidelně využívány. Skleníky byly vybaveny automatickým systémem řídícím teplotu ve skleníku, dodáváním čerstvého vzduchu, stínícím zařízením v případě světlu citlivých rostlin či hlídáním intenzity světla. Skleníky byly plně automatizované a řízené počítačem, který navíc sbíral aktuální data o podmínkách ve všech sklenících. Experimenty tedy probíhají pod neustálou kontrolou okolních podmínek, která jsou na vyžádání stažena a zaslána vlastníku experimentu.

Obr. 45 Skleníkový areál na Monash University. Práce probíhaly ve druhém skleníku zprava.

Experimenty byly realizovány pro tři druhy rostlin – ředkvička setá, hlávkový salát a špenát setý. Pro skleníkové experimenty byly vybrány 4 druhy studovaných materiálů – superabsorbenty (SAPs) s NPK, superabsorbenty s NPK (vyvinuté na FCH VUT v Brně [186]) a lignohumátem A, lignohumát A v podobě vodného roztoku a NPK v práškové formě. Vzorek s obsahem pouze NPK sloužil jako kontrolní vzorek. Pro každý přípravek a každou rostlinu bylo nutné připravit 5 opakovacích vzorků, aby bylo možné data statisticky a správně vyhodnotit. Z toho plyne, že celkem bylo připraveno 60 vzorků květináčů, o které se bylo nutné během růstu postarat a na závěr experimentů provést zhodnocení a analýzu rostlin a půdy.

6.3.2 Příprava půdy

Před samotnou přípravou květináčů bylo nutné nasbírat vhodnou zeminu. Pro naše účely byla využita půda z oblasti Cranbourne (CB), což je jedna z periferních částí Melbourne (Austrálie). Tato půda je ochuzená o živiny a minerály, respektive dosahuje velmi nízkých hodnot těchto látek, což dělá půdu vhodnou pro studium efektu huminových látek na růst a kvalitu rostlin.

Pro 60 květináčů bylo nutné připravit kolem 120 kg půdy, ta byla rozprostřena na plachtu a byla vysušena na stole po dobu 1 týdne (Obr. 46 vlevo). Teplota stolu odpovídala 25 °C a teplota vzduchu ve skleníku byla 23±2 °C. Během týdne bylo nutné půdu průběžně promíchávat, aby ve spodní části nezůstávala vlhká. Následně bylo nutné půdu přesít přes síto a zbavit ji tak kořínků, zbylých rostlin a živočichů. Při prosévání bylo nutné použít ochranou roušku (Obr. 46 vpravo), kvůli vdechování prachových částic. Dobře vysušená a prosetá zemina byla použita pro skleníkové experimenty.

Obr. 46 Jedna z částí nasbírané půdy pro skleníkové experimenty a její sušení (vlevo) a prosévání půdy (vpravo).

6.3.3 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 (Tab. 6).

Tab. 6 Přehled vzorků a jejich označení pro skleníkové experimenty.

Rostlina	typ přípravku	č. vzor.	č. vzor.	č. vzor.	č. vzor.	č. vzor.
Ředkvička setá	**SAPs (NPK)**	1	2	3	11	12
	NPK+LH	36	37	38	39	40
	SAPs (NPK+LH)	6	7	8	9	10
	NPK	46	47	48	49	50
Špenát setý	**SAPs (NPK)**	13	14	15	16	17
	NPK+LH	31	32	33	34	35
	SAPs (NPK+LH)	21	22	23	24	25
	NPK	51	52	53	54	55
Hlávkový salát setý	**SAPs (NPK)**	4	5	18	19	20
	NPK+LH	41	42	43	44	45
	SAPs (NPK+LH)	26	27	28	29	30
	NPK	56	57	58	59	60

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 (diskutováno v kap. 9).

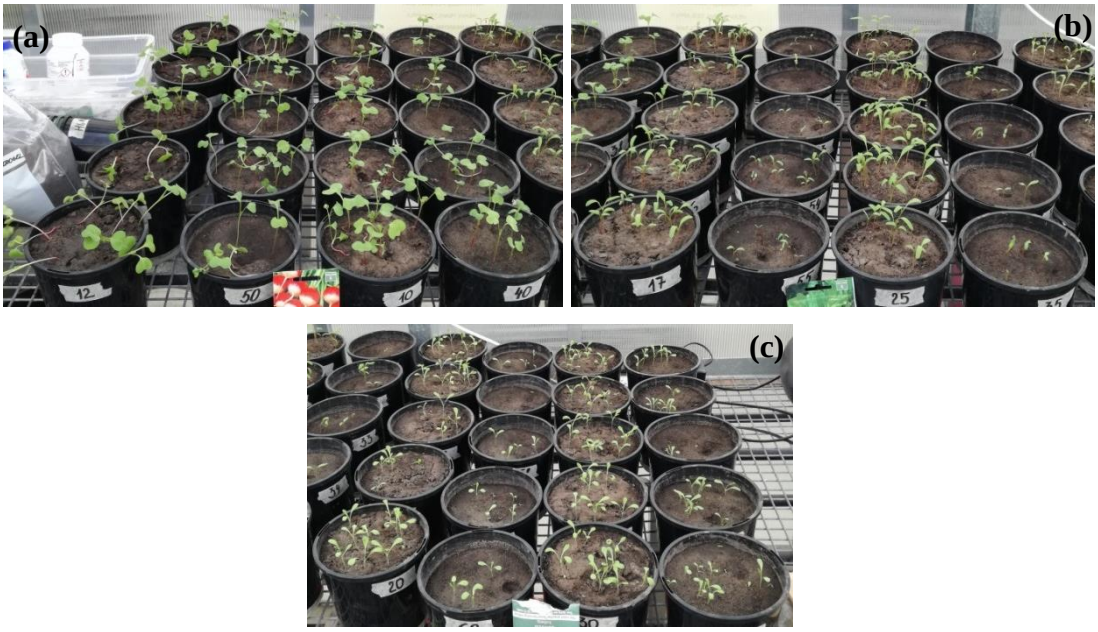
Do květináče byla přidána voda, tak aby odpovídala 70 hm. % vodní kapacity, do vlhké půdy bylo zaseto vždy 10 semínek z jedné rostliny (Obr. 47). Květináče byly na závěr zváženy a jejich celkové hmotnosti byly zaznamenány, aby bylo možné na základě úbytku hmotnosti doplnit vodu do původní hmotnosti.

Obr. 47 Vzorky květináčů připravených pro skleníkové experimenty. Vzorek obsahující pouze NPK, respektive NPK s LH (vlevo), vzorek s nabotnaným SAPs s NPK, respektive NPK a LH (vpravo).

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.

6.3.4 Jednocení rostlin a průběžné hodnocení

Po 14 dnech dosáhly rostliny dostatečného vzrůstu (Obr. 48), aby mohlo dojít ke stanovení jejich fotosenzivity a zároveň, aby mohlo dojít k jejich protrhávání, kdy v každém květináči zbyla pouze 1 rostlina. Vždy byl zvolen ten nejlepší reprezentant s dobrým vzrůstem a zdravým vzhledem. Zpravidla byly preferovány rostliny zprostřed květináče, aby měly dostatek místa k růstu.

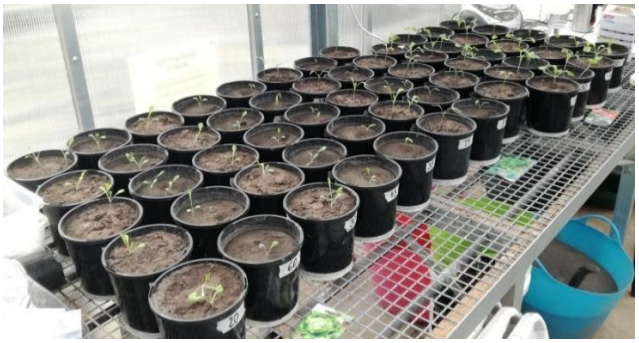


Obr. 48 Vzhled a kondice rostlin před vytrháváním. (a) Ředkvička setá – SAPs (NPK), NPK+LH, SAPs (NPK+LH) a NPK (zleva); (b) hlávkový salát setý – SAPs (NPK), NPK+LH, SAPs (NPK-LH) a NPK (zleva) a (c) špenát setý – SAPs (NPK), NPK+LH, SAPs (NPK+LH) a NPK (zleva).

V běžné praxi jsou tyto protrhané rostliny vyhazovány do odpadu, ale vzhledem k markantním rozdílům mezi rostlinami z květináčů obsahující SAPs a květináčů bez nich, bylo zajímavé provést jednoduché charakterizace vytržených rostlin a porovnat výsledky mezi sebou. Tím byly získány prvotní rozdíly ve vzorcích rostlin již před jejich plným vzrůstem. Těmito jednoduchými charakteristikami je míněno měření výšky rostlin a jejich hmotnost (Obr. 49)

Obr. 49 Ukázka vytržených rostlin a způsob měření. Ředkvička (vlevo) a hlávkový salát (vpravo).

Na následujícím obrázku (Obr. 50) jsou zachyceny květináče s obsahem jedné nejvhodnější rostliny pro dokončení experimentů pěstování, jejichž pozice byly pravidelně měněny. Opět platilo pravidlo, že co 2 dny byla do květináčů přidávána voda, aby rostliny neuhynuly.



Obr. 50 Přehled vzorků rostlin pro dokončení skleníkových experimentu.

6.3.5 Sklizeň rostlin

Po 2 měsících od zasetí byly skleníkové experimenty ukončeny a byla provedena sklizeň rostlin. 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.

Samotná sklizeň zabrala 1 týden. Při sklizni hlávkového salátu a špenátu bylo nutné oddělit listy rostlin od kořenového systému a to tak, aby rostlina byla zkrácena u všech vzorků stejně. Hlína s kořeny byla vysypána na tác, z hlíny byly vybrány veškeré kořeny, opět bylo manipulováno s kořeny opatrně, aby nedošlo k jejich velkému poškození. Kořeny byly kladeny na síto, na němž byly omyty proudem vody, aby byly zbaveny hlíny, případně SAPs. Poté byly kořeny osušeny papírovým ubrouskem, byly zabaleny do nového papírového ubrousku a dány do papírového pytlíku. Listy rostliny byly zváženy na vahách v čerstvém stavu, a poté byly rovněž dány do papírového pytlíku ke kořenům.

Hlína byla poté použita pro další zpracování, a to stanovení vlhkosti půdy, pH a elektrické vodivosti, o nichž je psáno v kapitole 6.3.6. Dále byl u vzorků půd stanoven obsah dusíku a fosforu, čemuž je věnována kapitola 6.3.7.

Vzorky ředkvičky seté byly zpracovávány obdobným způsobem, celý květináč byl vysypán na tác, opatrně byla odebrána ředkvička i s kořenem. Ta byla omyta vodou, vysušena a poté zvážena a změřena. Listy ředkvičky byly zváženy v čerstvém stavu, poté byly zváženy samotné plody ředkve a na závěr byla ředkvička rozříznuta na polovinu a byl změřen její průměr. Hlína byla zpracována obdobným způsobem jako v předešlém případě.

U všech vzorků byla provedena důkladná dokumentace z vážení hmotnosti, z měření délky listů, kořenů apod. Všechny vzorky byly zdokumentovány i fotograficky, aby je bylo možné porovnat a pozorovat rozdíly mezi jednotlivými vzorky.

6.3.6 Stanovení vlhkosti půdy, elektrické vodivosti v půdě a pH

Hlína, cca 30 g, byla odvážena do hliníkové misky a její hmotnost byla zaznamenána, poté byla ponechána na stole při konstantní teplotě stolu 25 °C a vzduchu 23±2 °C k vysušení. Po 4 dnech byly hliníkové misky s hlínou vloženy do sušárny pro jejich dosušení, teplota sušárny byla nastavena na teplotu 120 °C a vzorky byly sušeny po dobu 2 dnů. Po této době byly vzorky hlíny znovu zváženy a byla zjištěna jejich hmotnost, respektive vlhkost půdy.

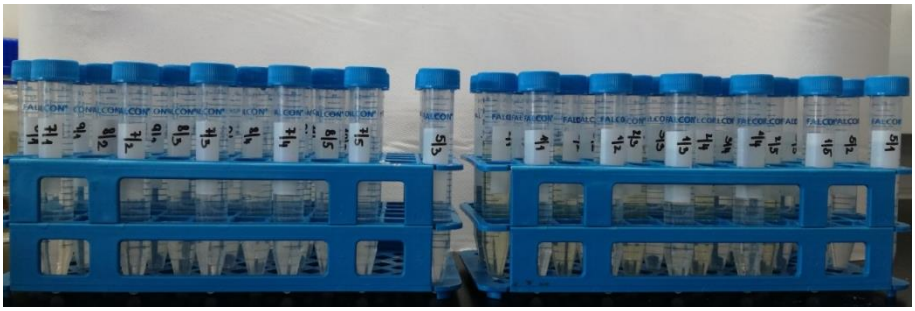
Elektrická vodivost a pH půdy byla změřena standardní metodou pH a konduktometrie. Pro přípravu vzorku byl využit postup používaný v Austrálii [177], který je založen na přípravě suspenze půda/voda v poměru 1:5. Všechny vzorky půd ze skleníkových experimentů byly tedy odváženy do 50 ml centrifugačních zkumavek, které pak byly zality čistou destilovanou vodou. Zkumavky byly uzavřeny a byly třepány po dobu 1 hodiny při 140 ot./min.

Po uvedené době, byly vzorky míchány na magnetické míchačce a byla u nich změřena hodnota elektrické vodivost a následně pH. Měření byla provedena minimálně třikrát. Stanovení elektrické vodivosti a pH bylo provedeno pro půdy skleníkových experimentů i pro půdy z inkubačních experimentů (kap. 6.4).

6.3.7 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 odstřeďování vzorků v centrifuze (Termo Fischer Science, model 6890). Vzorky byly odstřeďovány za následujících podmínek 4 500 ot./min. po dobu 5 minut. Po odstředění byly vzorky zfiltrovány přes filtrační papír do nových 25 ml plastových zkumavek, které byly pečlivě označeny číslem vzorku (Obr. 51). Vzorky byly využity pro další analýzy nebo byly ihned zamraženy, aby nedocházelo k jejich znehodnocování.



Obr. 51 Extrakty vzorků půd připravených pro analýzu.

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 zchladnutí 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. 7 Referenční hodnoty pro přípravu vzorku v očekávaném koncentračním rozmězí NO_3^- – N.

$NO_3^- - N$ (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 mikrodestiček určených pro měření UV-VIS spektrometrie a k nim byl přidán reakční roztok. Objem roztoku vzorků a reagentu byl navržen podle tabulky (Tab. 7) a na základě zkušeností australských kolegů byl vybrán poměr pro 1–10 ppm $NO_3^- - N$. V případě, že by koncentrace byla příliš vysoká, respektive nízká, bylo by nutné analýzu zopakovat pro jiný poměr roztoků. Analýza probíhala tak, že do mikrodestiček byly pipetovány extrahované vzorky půd, a to o objemu 13 µl, dále byl k nim přidán připravený reakční roztok o objemu 287 µl.

Obr. 52 Vzorky připravené koncentrační řady pro standard $\mathbf{NO_3^-}$–N a $\mathbf{NH_4^+}$–N.

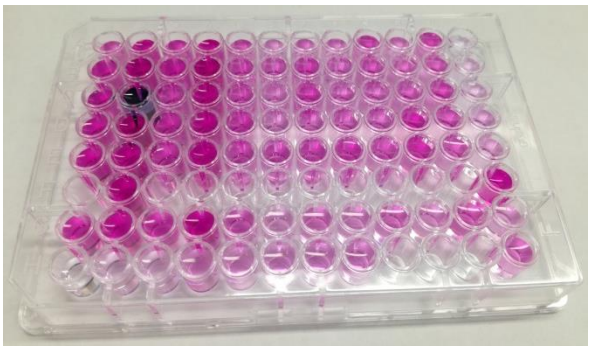
Rovněž byla připravena kalibrační řada, díky níž bylo možné stanovit koncentrace dusíku v jednotlivých vzorcích. Pro kalibrační řadu bylo využito standardního roztoku $NO_3^- - N$ od Sigmy-Aldrich. Pro analýzu bylo využito 200 µl standardu a 1 800 µl 2M KCl, čímž vznikl roztok o koncentraci 100 µg NO_3^- na 1 ml 2M KCl. Tento standardní roztok byl následně použit pro přípravu kalibrační řady, která byla připravena do plastových nádobek (Obr. 52) o objemu 3 ml, a která odpovídala hodnotám uvedeným v tabulce (Tab. 8).

Tab. 8 Příprava koncentrační řady $\mathbf{NO_3^- - N}$ standardu.

Standard $NO_3^- - N$	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
48	480	520

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 $NO_3^- - N$ pro reálné vzorky. Po přípravě všech vzorků byly mikrodestičky přiklopeny víkem, označeny popisem a dán do digestoře. Reakce probíhala po dobu 16 hodin, kdy vzorky se zbarvily do růžova (Obr. 53), a poté

byly změřeny na UV-VIS spektrofotometru (Thermo Fischer Science, Multiscan Go) pro vlnovou délku 540 nm.



Obr. 53 Příklad pozitivní reakce na dusík vázaný přes dusičnanový anion.

První 4 sloupce vzorků měly příliš vysokou koncentraci, proto bylo nutné analýzu zopakovat a vzorky vhodně naředit dle tabulky (Tab. 7) a celý proces přípravy zopakovat.

Stanovení NH_4^+– N obsaženého v extraktu půdy

Pro stanovení NH_4^+– N ve vzorcích půdy je zapotřebí rovněž extrahovaných vzorků půdy (Obr. 51). Pozitivní reakce pro stanovení NH_4^+– 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 vínanu 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 $NH_4^+ - N$ zakoupeného od firmy Sigma-Aldrich. Tento roztok byl naředěn tak, aby jeho koncentrace odpovídala 50 µg 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 (Obr. 52). Koncentrační řada byla připravena dle uvedené tabulky níže (Tab. 9).

Tab. 9 Příprava koncentrační řady $\mathbf{NH_4^+ - N}$ standardu.

Standard $NH_4^+ - N$ (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

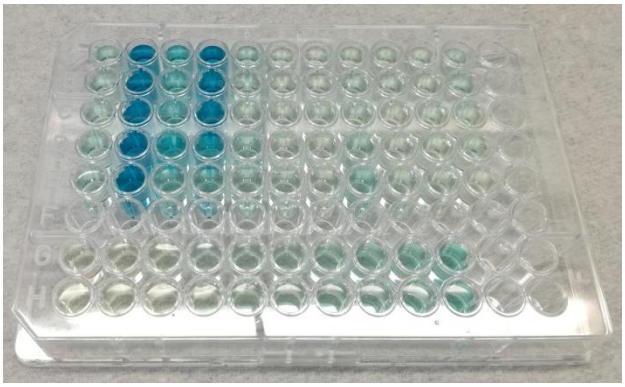
Připravené roztoky koncentrační řady a reálných vzorků mohly být použity pro $NH_4^+ - N$ analýzu. Pro tuto reakci bylo důležité dodržet následujícího postupu, respektive poměry jednotlivých reakčních roztoků a připravených vzorků, respektive kalibračních roztoků. Poměry, podle kterých byly roztoky do mikrodestiček pipetovány, byly zvoleny na základě tabulky (Tab. 10). Opět na základě zkušeností byl vybrán poměr odpovídající 0–10 ppm $NH_4^+ - N$.

Tab. 10 Referenční hodnoty pro přípravu vzorku v očekávaném koncentračním rozmězí $\mathbf{NH_4^+ - N}$.

$\mathbf{NH_4^+ - N}$ (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. 54) 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 $NH_4^+ - N$ jsou příliš vysoké (syté zabarvení reakce), proto bylo nutné tyto vzorky vhodně naředit dle výše uvedené tabulky (Tab. 10).



Obr. 54 Příklad pozitivní reakce na dusík vázaný pře amonný kationt.

6.4 Inkubační testy

Inkubační testy jsou testy, které nám mají odhalit, jak se bude daný agrochemický přípravek chovat v půdě, a zda umožňuje vznik vhodných podmínek pro vznik a růst půdních bakterií, které významně ovlivňují růst rostlin. Rovněž tyto testy můžeme označit jako jakési modelové zkoušky, díky nimž můžeme posoudit stav půdy v přítomnosti agrochemických přípravků.

6.4.1 Příprava vzorků a nastavení podmínek

Pro inkubační testy byly zvoleny plastové nádoby s uzávěrem o objemu 100 ml. Do nich bylo naváženo 50 g CB půdy, ve které byly zamíchány dostupné produkty od firmy Amagro s.r.o. a superabsorbenty připravené na FCH VUT v Brně. Pro tyto testy byly provedeny 2 replikační experimenty, první experiment obsahoval stejná množství, jako tomu bylo u skleníkových experimentů a druhý test obsahoval koncentrace 5krát vyšší. Pouze u kontrolního vzorku (NPK) byl proveden test pouze pro jednu koncentraci, a to koncentraci odpovídající skleníkovým experimentům.

Pro každý produkt bylo nutné připravit 5 opakujících se vzorků pro pozdější statistické vyhodnocení, souhrn všech vzorků je uveden v tabulce (Tab. 11).

Tab. 11 Přehled a označení vzorků pro inkubační testy.

	CB půda	
Typ přípravku	**1. replikační série vzorků**	**2. replikační série vzorků**
SAPs (NPK+LH)	1/1 – 1/5	2/1 – 2/5
SAPs (NPK)	3/1 – 3/5	4/1 – 4/5
Vitalic	5/1 – 5/5	8/1 – 8/5
Ligno Aktivátor	6/1 – 6/5	9/1 – 9/5
Lignohumát A	7/1 – 7/5	10/1 – 10/5
Kontrola (NPK)	11/1 – 11/5	–

Pro inkubační experimenty byly zvoleny přípravky a koncentrace uvedené v tabulce (Tab. 12). Koncentrace přípravků byly zvoleny na základě informací uvedených na obalech produktů, tedy jejich koncentrace běžně aplikované na 1 ha půdy. Ty byly přepočítány pro 50 g vzorku půdy. Inkubační testy byly dále podrobeny replikačním testům, což jsou testy založené na stejných vzorcích půdy a použitých přípravků, avšak s obsahem vyšší koncentrace těchto preparátů.

Tab. 12 Přehled vzorků pro inkubační testy a koncentrace použitých přípravků.

	CB půda	
Typ přípravku	**1. replikační série vzorků**	**2. replikační série vzorků**
Ligno Aktivátor	0,000 5 hm. %	0,002 5 hm. %
Vitalic	0,160 0 hm. %	0,800 0 hm. %
Lignohumát A	0,010 0 hm. %	0,050 0 hm. %
SAPs (NPK)	0,200 0 hm. %	1,000 0 hm. %
SAPs (NPK+LH)	0,200 0 hm. %	1,000 0 hm. %
NPK	0,000 6 hm. % N, 0,000 9 hm. % P a 0,000 3 hm. % K	0,003 0 hm. % N, 0,004 5 hm. % P, 0,001 5 hm. %K

Díky těmto experimentům je možné zjistit, zdali vzorky budou mít ještě lepší vliv na přípravu kvalitního prostředí pro vznik a růst bakterií, anebo zdali se vyšší koncentrace agrochemických přípravků projeví negativně. Tím je myšleno, zdali dojde k zastavení růstu plynů oxidu uhličitého, respektive k rapidnímu nárůstu oxidu dusného v půdě, což by se samozřejmě negativně podepsalo na populaci nitrifikačních bakterií, které se podílejí na správné funkci půdy.

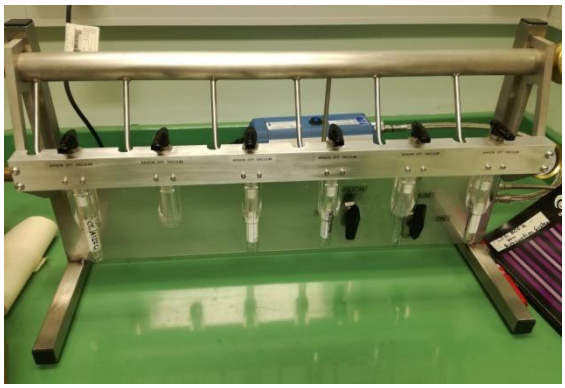
Obr. 55 Vzorky pro inkubační testy. Vzorky před vkládáním do inkubátoru.

Připravené vzorky půdy s produkty byly zality vodou, která odpovídala 70 % vodní kapacity půdy. Všechny nádobky byly zváženy kvůli pozdějšímu přidávání vody. Poté byly všechny vzorky opatřeny plastovým víčkem, které navíc obsahovaly pryžové zátky pro pozdější odebírání plynů (

Obr. 55). Plastová víčka byla ponechána mírně otevřená a vzorky byly uschovány v inkubátoru při konstantní teplotě 24 °C.

6.4.2 Odebírání vzorků a jejich měření na plynové chromatografii (GC)

První odebírání plynů ze vzorku probíhalo v den přípravy, kdy nádoby byly uzavřeny, takto byly ponechány po dobu 1 hodiny, poté byly mírně pootevřeny a znovu opět uzavřeny, odebírání vzorků probíhalo po 10 minutách od uzavření vzorků. Vzorky byly odebírány injekční stříkačkou, plyny byly dávkovány do předem připravených vakuovaných baněk (Obr. 56) běžně užívaných pro plynovou chromatografii, které byly připraveny před započetím odběrů.



Obr. 56 Vakuování baněk pro plynovou chromatografii.

Po odebrání vzorků byla víčka zafixována na nádobkách papírovou páskou tak, aby nádobky zůstaly mírně pootevřené, pak byly všechny nádoby dány do inkubátoru, který udržoval teplotu na 24 °C. Po 24 hodinách došlo k odebírání druhé sady vzorků, stejným způsobem jako bylo popsáno výše. Nádobky byly uzavřeny a do 10 minut od uzavření byly odebírány vzorky plynů, které byly dávkovány do vakuovaných baněk. Po odebrání vzorků byly nádobky opět otevřeny, byla k nim přidána odpařená voda a vzorky byly stejným způsobem uschovány do inkubátoru. Další odebírání vzorků proběhlo po 3 dnech, a poté vždy každý týden dvakrát, na začátku a na konci týdne. Vzorky byly odebírány celkem po dobu 1 měsíce.

Součástí plynové chromatografie jsou 2 držáky na vzorky, kam bylo možné umístit 120 vzorků, tedy 60 vzorků na 1 držák. U plynové chromatografie platí, že mezi každým 20–30 vzorkem je zapotřebí vložit vzorky vzduchu a standardu. Měření na GC probíhalo každý týden. Pro naše účely byla použita plynová chromatografie od firmy Agilent Technologies, model 6890 a měření probíhalo

v programu GHG (online). Plynovou chromatografií bylo možné stanovit a vypočítat koncentrace oxidu uhličitého a oxidu dusného ve studovaných vzorcích půdy.

6.4.3 Stanovení vlhkosti, elektrické vodivosti a pH u inkubačních vzorků

Na závěr byly provedeny stejné charakterizace půdy, jako tomu bylo u skleníkových experimentů. V prvním případě byla u všech vzorků provedena měření vlhkosti půdy. Do hliníkových misek bylo odváženo cca po 15 g půdy z inkubačních testů. Zbylá půda byla využita pro měření pH a elektrické vodivosti, což bylo provedeno stejným způsobem jako v kapitole 6.3.6.

6.4.4 Stanovování NO_3^-—N a NH_4^+–N ve vzorcích inkubačních testů

Rovněž vzorky inkubačních testů byly podrobeny stanovení dusíku a fosforu. Pro tyto analýzy bylo využito postupů podrobně popsaných již v kapitole 6.3.7. Tyto výsledky sloužily k posouzení chování zemědělských přípravků v půdě a jejich vliv na tvorbu CO_2 a N_2O plynů v půdě, a tudíž vliv na vznik nitrifikačních bakterií.

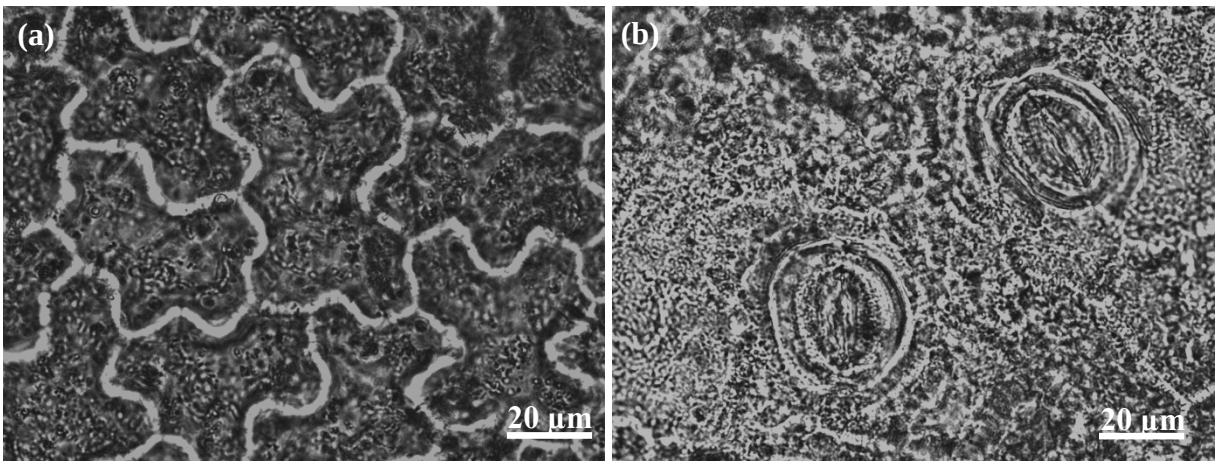
7 VÝSLEDKY A DISKUZE – EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST I

7.1 Charakterizace rostlinných kutikul

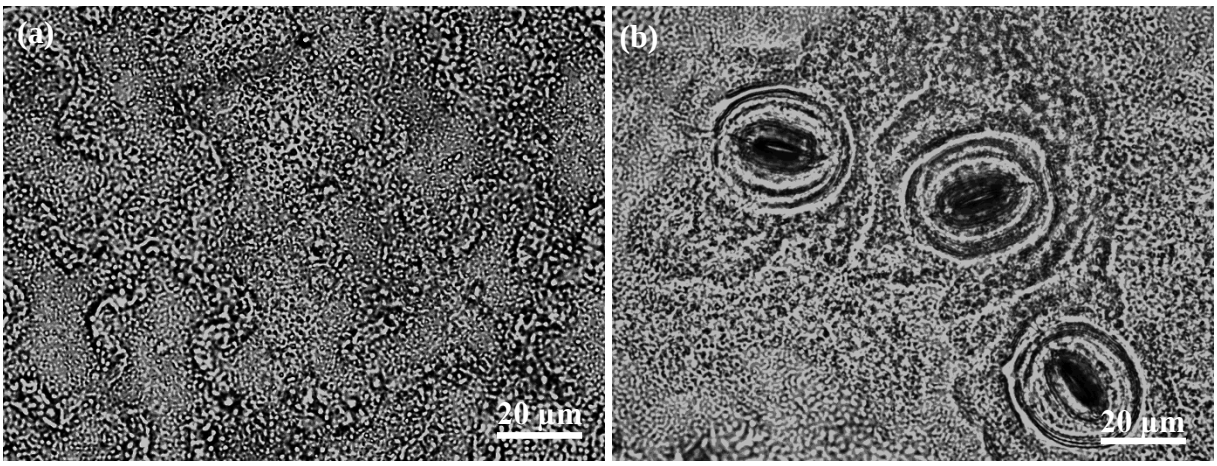
Po izolaci rostlinných kutikul bylo provedeno měření na optickém mikroskopu, aby byly kutikuly rozlišeny dle jejich struktury na abaxiální a adaxiální. Kutikuly byly dále využity pro charakterizace na optickém mikroskopu, SEM a dalších technikách, proto bylo nutné kutikuly rozprostřít na mikroskla a nechat je volně vysušit.

7.1.1 Optická mikroskopie

Optická mikroskopie byla prováděna na mikroskopu Nikon Eclips C*i* (Příloha 2), který sloužil k základnímu rozřazení kutikul na dva typy (horní, spodní). Naopak detailnější měření kutikul byla realizována na mikroskopu Olympus IX71 (Příloha 1). Na základě vytvořených snímků bylo provedeno zhodnocení rozdílů mezi adaxiální a abaxiální stranou kutikuly a rovněž mezi kutikulami izolovanými chemickou (Obr. 57) a enzymatickou metodou (Obr. 58).



Obr. 57 Snímky z optického mikroskopu pro adaxiální (a) a abaxiální (b) kutikulu izolovanou chemickou metodou. Snímky byly pořízeny při 60násobném zvětšení.

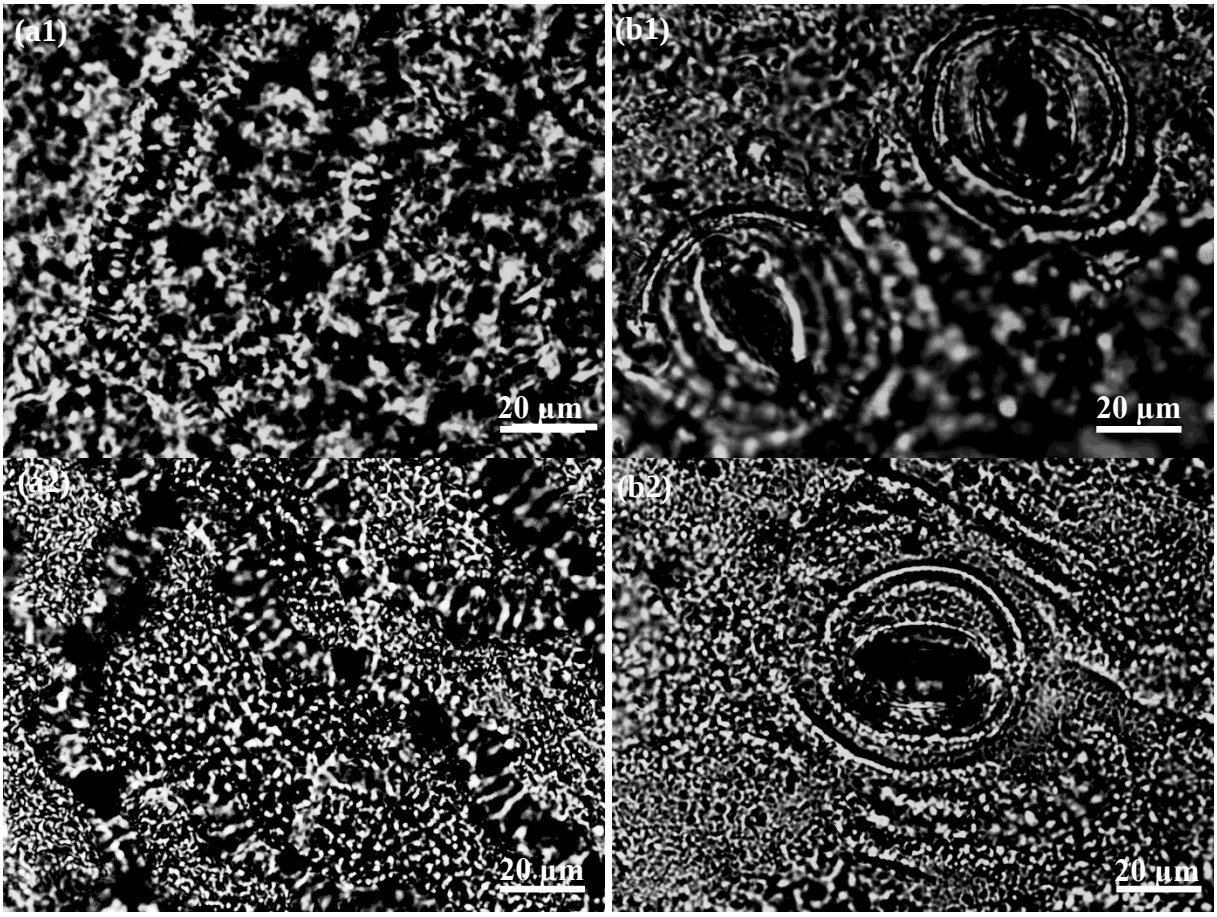


Obr. 58 Snímky z optického mikroskopu pro adaxiální (a) a abaxiální stranu (b) kutikuly izolovanou enzymatickou metodou. Snímky byly pořízeny při 60násobném zvětšení.

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 nepoukazovaly 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 na tvorbě kutikuly (Obr. 59 a, b1), naopak enzymaticky izolované kutikuly se jeví víc kompaktní, tvořené z malých částicových struktur (Obr. 59 a, b2).



Obr. 59 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 (Příloha 9, Příloha 10). 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.

7.1.2 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenčním mikroskopem je možné zaznamenávat fluorescenci látek přidávaných do studovaného materiálu uměle (fluorescenční sondy) nebo je možné sledovat fluorescenci látek přirozeně se vyskytujících v těchto studovaných materiálech. Rostlinné kutikuly se vyznačují velmi silnou autofluorescencí, která je způsobena přítomnými fenolickými sloučeninami tzv. flavonoidy [174], [178]–[181]. Nejčastěji vázanými flavonoidy obsaženými např. v kutikulách rajčat jsou chalkonaringenin, naringenin, naringenin-7-glucoside a falvonon [182], [183].

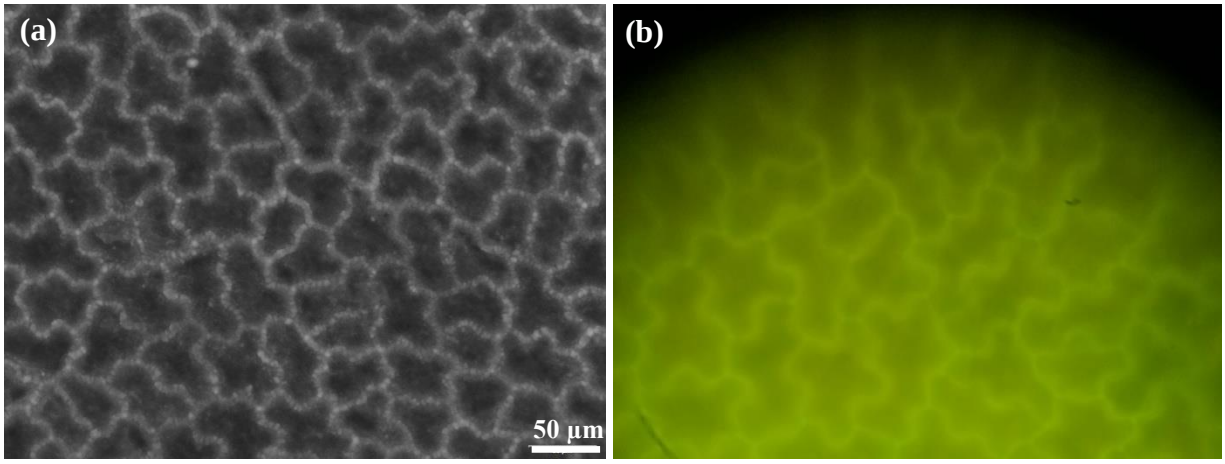
Pro měření autofluorescence kutikul byl použit mikroskop Olympus IX71, který je vybaven excitační lampou. Vzorky byly vystaveny působení této lampy a při měření navíc byly využity všechny dostupné filtry (365, 405, 470, 530 a 552 nm), které jsou rovněž součástí přístroje a díky nimž bylo propouštěno světlo pouze o definované vlnové délce, čímž bylo možné zjistit, zda kutikula podléhá autofluorescenci při všech vlnových délkách nebo nikoli.

Z dostupných měření bylo zjištěno, že kutikula izolovaná z listu *Prunus laurocerasus* vykazuje autofluorescenci při všech použitých filtrech. Avšak bylo zjištěno, že chemicky a enzymaticky izolované kutikuly vykazují odlišné zbarvení při některých vlnových délkách, čímž byla zjištěna další odlišnost mezi jednotlivými kutikulami (Tab. 13).

Tab. 13 Barevný projev autofluorescence rostlinných kutikul izolovaných chemickou a enzymatickou metodou.

Filtr (nm)	Chemicky izolovaná kutikula	Enzymaticky izolovaná kutikula
365	modrá	zelená
405	zelená	oranžová
470	žluto-zelená	žluto-zelená
530	karmínově červená	karmínově červená
552	rudá	karmínově červená

Vzhledem k tomu, že kamera zabudovaná uvnitř mikroskopu umožňuje zachycení kutikul pouze v černo-bílém provedení (Obr. 60a), proto byly pořízeny snímky pomocí externí kamery. Tímto způsobem vznikly ne příliš kvalitní fotografie, ovšem pro základní orientaci jsou dostačující. Vzhledem k tomu, že se jedná o snímek pořízený z vnější kamery, nebylo možné ke snímku přiřadit adekvátní měřítko.



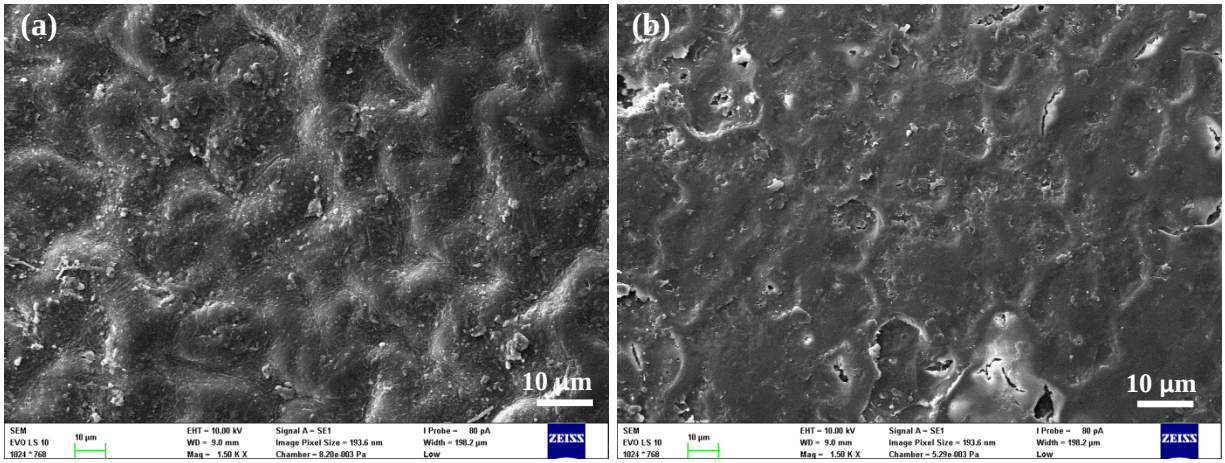
Obr. 60 Horní kutikula izolovaná chemickou metodou, snímek pořízený z fluorescenčního mikroskopu. (a) Originální snímek z interně zabudované kamery, (b) fotografie pořízená z externí kamery.

7.1.3 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

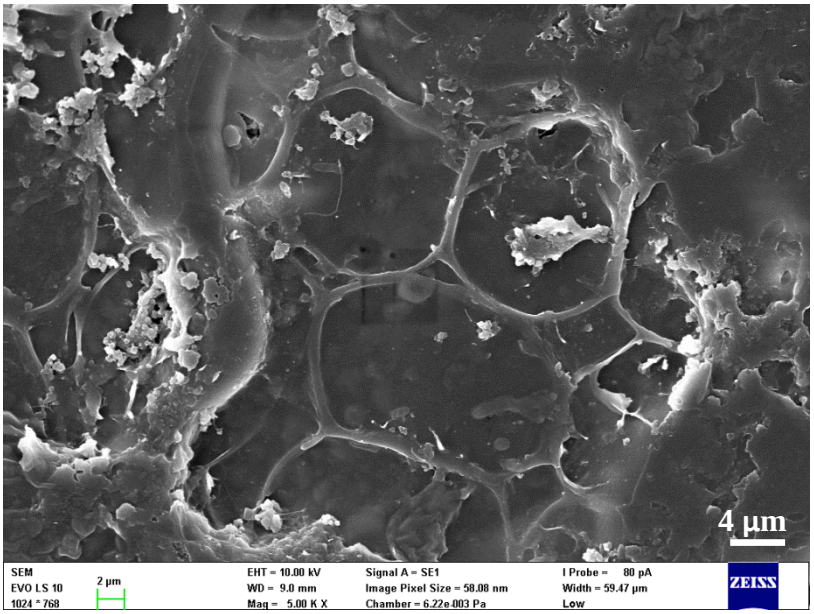
chemickou a enzymatickou metodou odlišují, respektive zda vůbec nějaké rozdíly budou pozorovány. Rovněž bylo nutné zjistit rozdíly v rámci jedné kutikuly, tedy ze strany izolace a ze strany vzduchu.

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 (kap. 7.3).



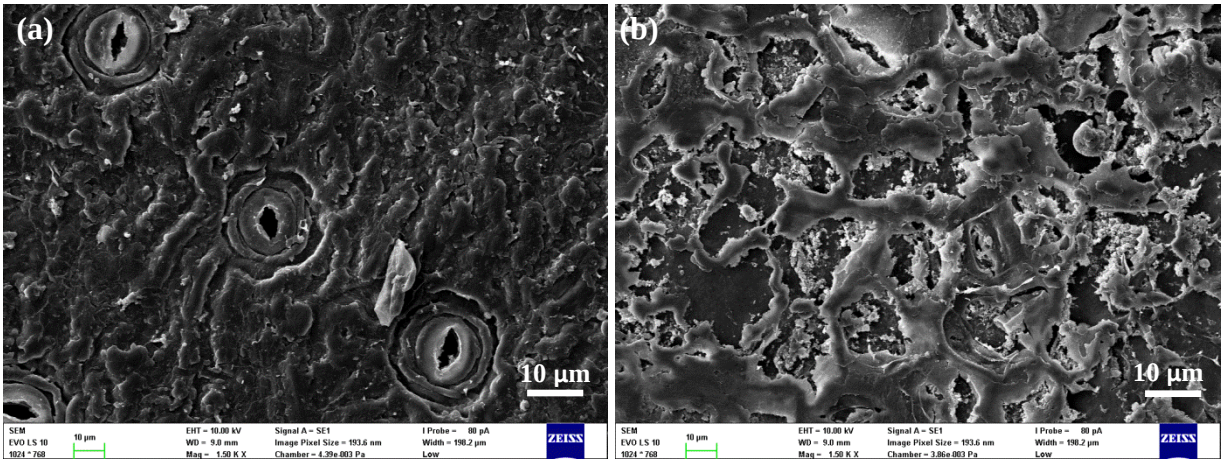
Obr. 61 Snímky ze SEM pro horní stranu kutikul izolované chemickou metodou izolace. Vlevo se nachází snímek kutikuly ze strany vzduchu (a), napravo se nachází snímek ze strany odstraněného mezofylu (b). Snímky byly pořízeny při 1 500násobném zvětšení.

Z Obr. 61a 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. 61b) se povrch jeví uceleně jen s mírnými znaky reliéfů pletiv. Vzhledem k tomu, že oba snímky jsou pořízeny při stejném zvětšení, je zřejmé, že jsou tyto povrchy odlišné. A právě na obrázku (Obr. 61b) je zachycena vrstva nedokonale odstraněných polymerů (kap. 2.7). Na snímku (Obr. 62) 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.



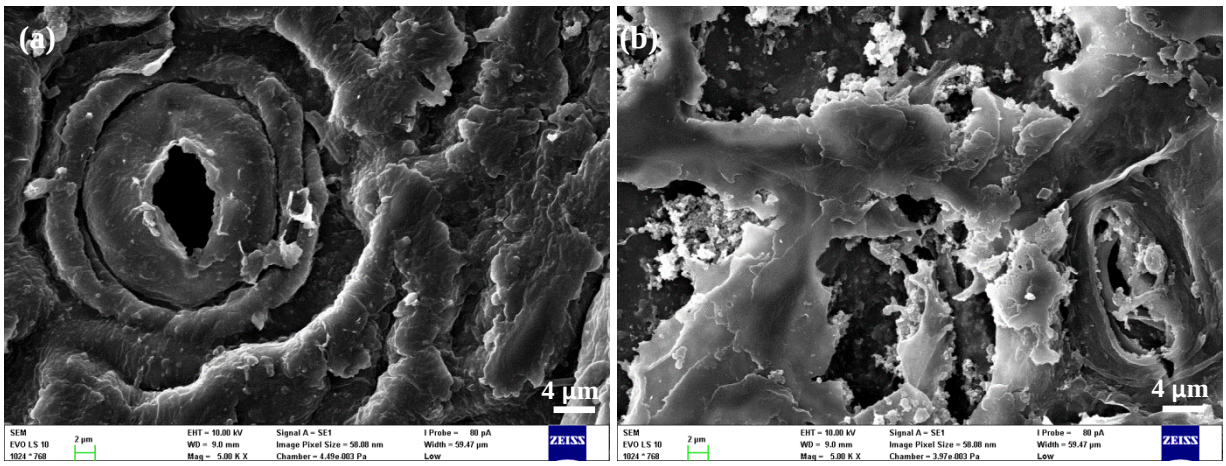
Obr. 62 Detail horní kutikuly izolované chemickou metodou. Snímek pořízený při 5 000násobném zvětšení.

Obdobné rozdíly byly také pozorovány pro spodní stranu kutikuly (Obr. 63). Vnější strana kutikuly (Obr. 63a) 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. 63b) byly tyto zbytky pozorovány po celém povrchu kutikuly, opět šlo o neodstraněné polysacharidy, které tak zapříčiňují vznik vrstvy ovlivňující difúzní experimenty.



Obr. 63 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.

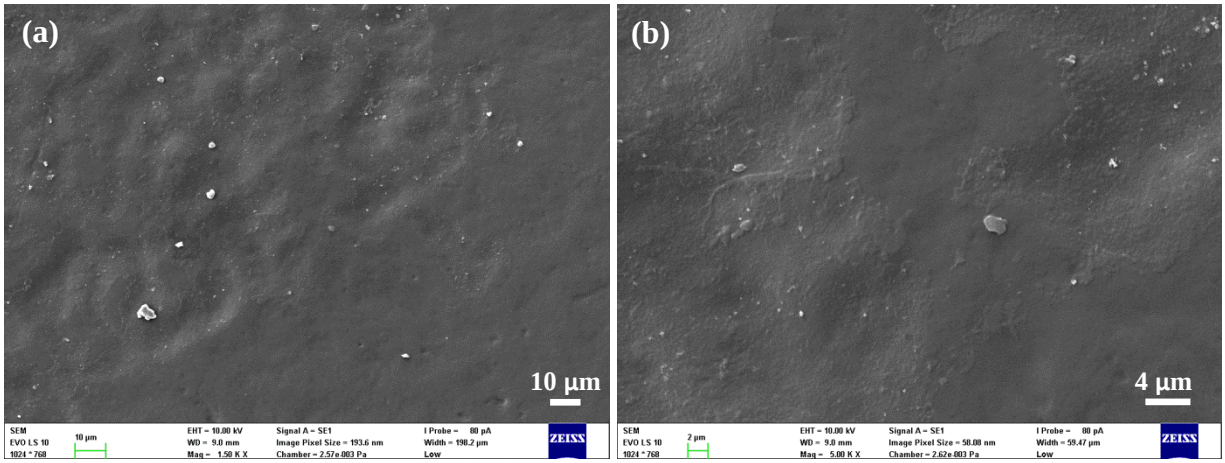
Pro abaxiální kutikuly byly pořízeny i detailní snímky stomat (Obr. 64), z vnější strany nejsou stomata ničím bráněna, ale z vnitřní strany se zde objevují neodstraněné zbytky polymerů, které nebyly úplně rozpuštěny v izolačním roztoku koncentrované kyseliny chlorovodíkové a chloridu zinečnatého.



Obr. 64 Detailní snímek abaxiální strany kutikuly izolované chemickou metodou. Vnější strana kutikuly (a), strana kutikuly odstraňování mezofylu (b). Snímek pořízený při 5 000násobném zvětšení.

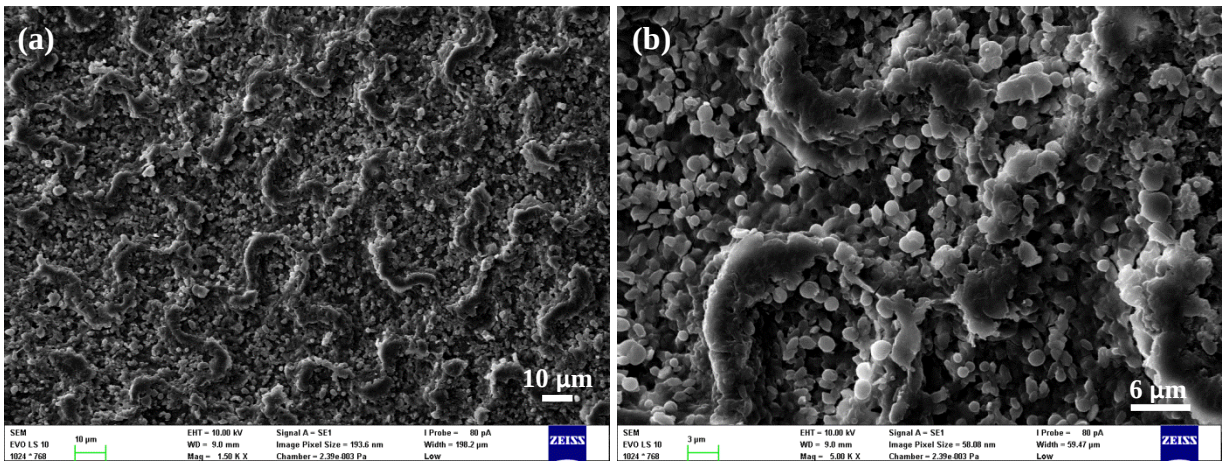
Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě enzymaticky izolovaných kutikul. Povrch kutikuly z vnější strany je hladký, dokonce zde nejsou pozorovatelná vyvýšená místa pletiv, jako tomu bylo v případě chemické metody izolace (Obr. 61a). Na povrchu jsou patrné pouze malé nečistoty, které zde utkvěly opět nedokonalým oplachem.

V případě adaxiální strany enzymaticky izolované kutikuly (Obr. 65a) nebyly pozorovány pro vnější stranu žádné výrazné struktury pletiv, celý povrch byl homogenní. Žádné výsledky nebyly dosaženy ani v případě 5 000násobného zvětšení (Obr. 65b), jak tomu bylo u chemicky izolovaných kutikul (Obr. 61a).



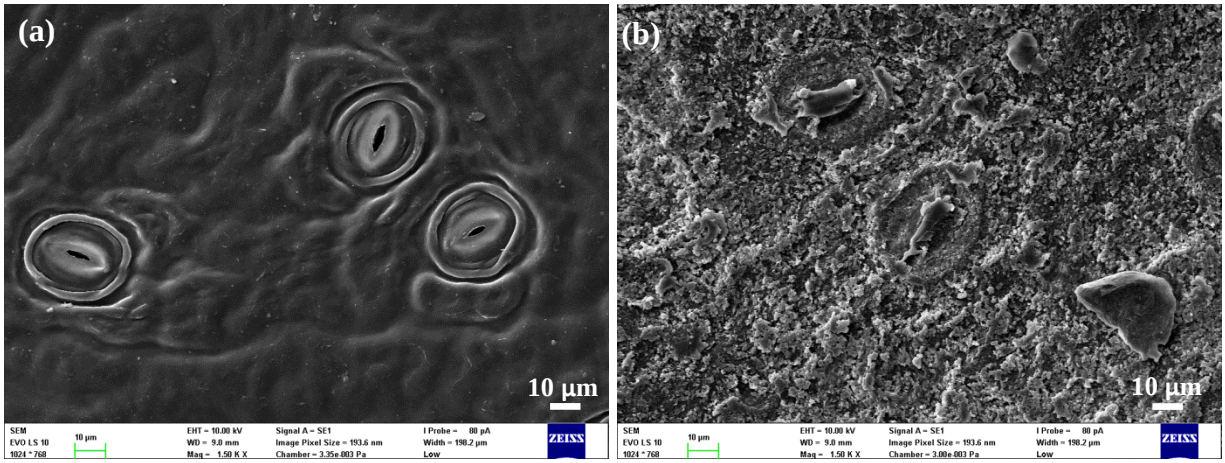
Obr. 65 Snímek adaxiální strany kutikuly izolované enzymatickou metodou. Povrch kutikuly z vnější strany (strana, kde není odstraňován mezofyl) (a), detailní snímek povrchu stejné kutikuly při 5 000násobném zvětšení (b).

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 tvořená z malých částic (Obr. 66b), struktura není tolik kompaktní, jako tomu bylo v případě chemicky izolovaných kutikul (Obr. 61). 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.



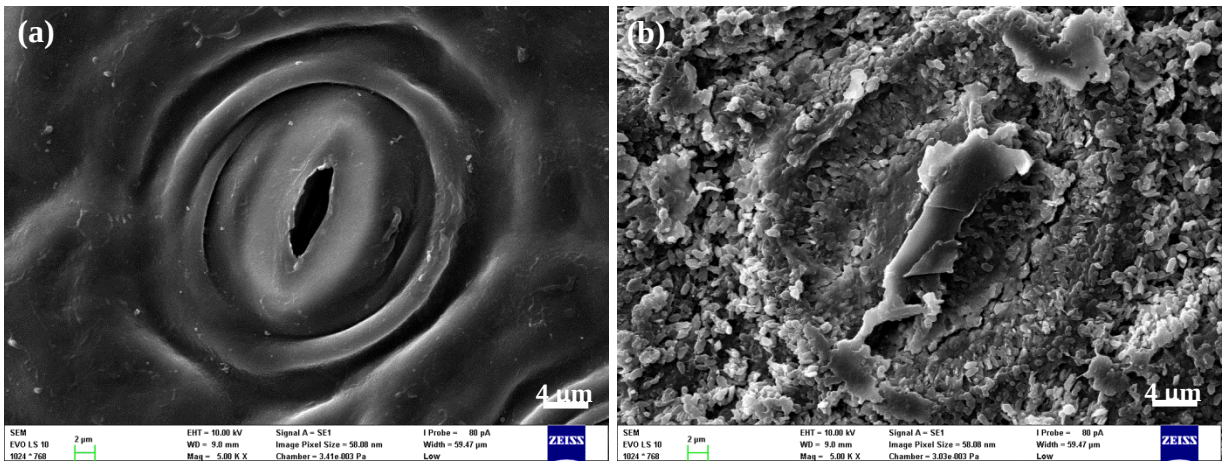
Obr. 66 Struktura adaxiální kutikuly izolované enzymatickou metodou. Celkový pohled na povrch kutikuly při 1 500násobném zvětšení (a), detailní snímek při 5 000násobném zvětšení (b).

Vezmeme-li v úvahu, že při samotné izolaci kutikul je mnohem jednoduší 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. 66b), kde může jít o lépe rozložené látky polymerů. V takovém případě by kutikula měla lepší penetrační vlastnosti, ovšem z výsledků obsažených v kapitole 7.3 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 (kap. 7.1.4). Tento fakt může hrát významnou roli v odlišnostech transportů látek skrze kutikuly, které byly realizovány v této práci (kap. 7.3).



Obr. 67 Snímky abaxiální strany enzymaticky izolované kutikuly. Vnější strana kutikuly (a), strana izolace mezofylu (b).

Na Obr. 67 jsou znázorněny snímky abaxiální strany kutikuly, kde obrázek (Obr. 67a) 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. 67b) 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. 68), kde je možné porovnat povrchy kutikul mezi sebou.



Obr. 68 Snímky abaxiální kutikuly izolované enzymatickou metodou pořízené při 5 000násobném zvětšení. Abaxiální kutikula z vnější strany (a), abaxiální kutikula ze strany izolace mezofylu (b).

7.1.4 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. 14) 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 tvorb 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. 14 Hodnoty tlouštěk a profilů rostlinných kutikul.

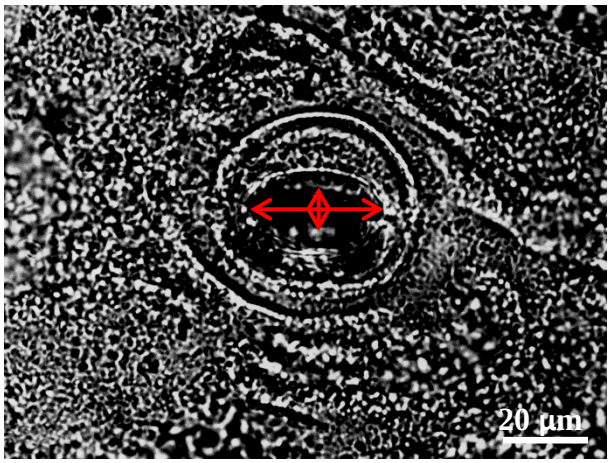
Typ izolace	typ kutikuly	průměrná tloušťka (µm)	průměrný profil (µm)
Chemická	**adaxiální**	5±1	1,0±0,5
	abaxiální	4±1	1,5±0,8
Enzymatická	**adaxiální**	9±1	0,7±0,1
	abaxiální	7±2	1,2±0,3

7.1.5 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 kapalné fázi, ale rovněž za transpiraci, a tedy výměnu plynů, regulaci vody atd. (kap. 2.7).

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. 69).

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

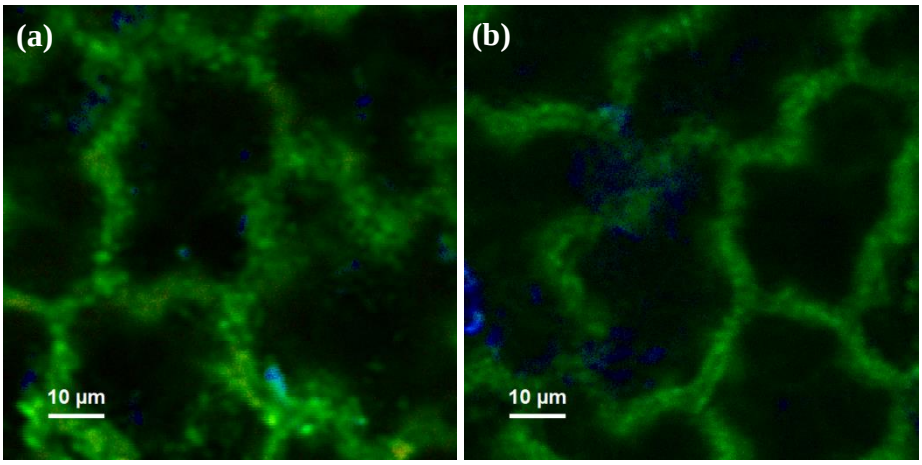


Obr. 69 Ukázka měření průduchu na abaxiální straně kutikuly.

7.1.6 Stanovení doby života fluorescence (FLIM)

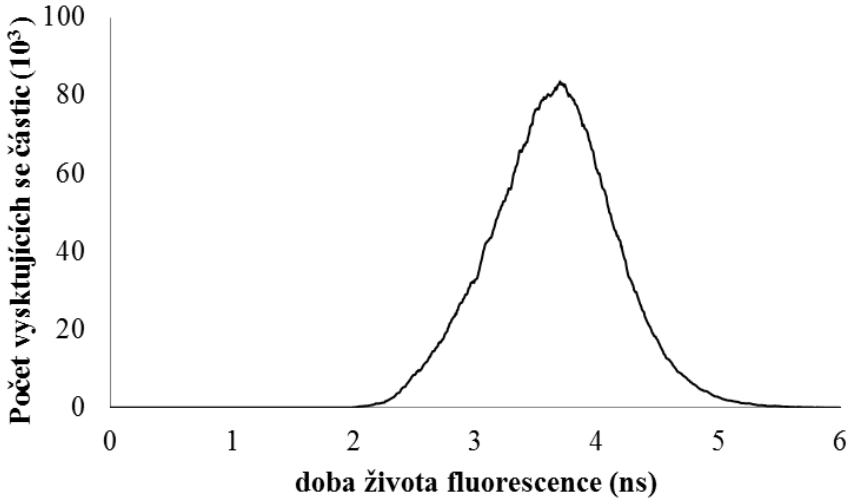
Charakterizace kutikul byla v poslední řadě doplněna o měření dob života fluorescence kutikul, které byly vystaveny působení tří různých prostředí – vzduch, voda a zředěný roztok lignohumátu draselného. Díky autofluorescenci kutikul bylo možné studovat, zda se s tímto materiálem ve zmíněných prostředích něco neděje (degradace, stárnutí, tvorba bakterií atd.) a zda je tento materiál stálý s časem, kvůli dlouhým difúzním experimentům. Prostřednictvím FLIM přístroje bylo možné

sledovat doby života fluorescence skupin obsažených v kutikulách, které způsobují právě autofluorescenci a studovat, zda nedochází s časem k jejich změnám.



Obr. 70 Snímky adaxiálních kutikul izolovaných chemickou metodou. Zaznamenávání v časových intervalech 0 dnů (v den izolace) (a) a po 11 dnech (b).

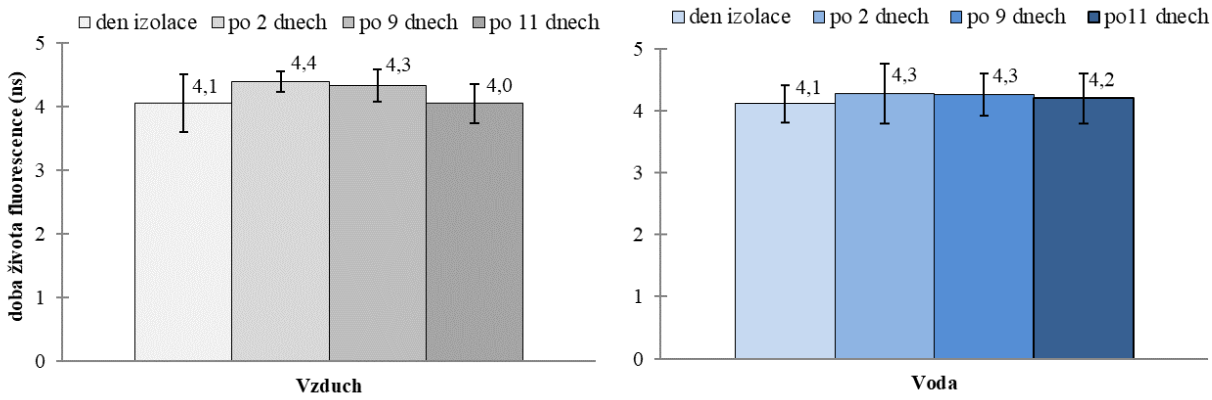
První série experimentů byla provedena na chemicky izolovaných kutikulách, a to jak pro adaxiální, tak abaxiální kutikuly. Ty byly uzavřeny v nádobkách pro prostředí vzduch a voda. Následně byly v určitých časových intervalech, až dosažení doby 11 dnů, proměřeny na FLIM přístroji. Výsledkem měření byly barevné snímky kutikul, na nichž je možné pozorovat intenzitu excitace molekul ve snímaných místech kutikuly (Obr. 70). Ze získaných snímků je vidět, že vzorky dosahují stejné intenzity excitace molekul, a tudíž nedochází s časem k jejich změně. To bylo potvrzeno i získanými distribučními křivkami dob života fluorescence (Obr. 71).



Obr. 71 Ukázka distribuční křivky dob života fluorescence kutikuly. Pro adaxiální stranu kutikuly izolovanou chemickou metodou v prostředí vzduchu.

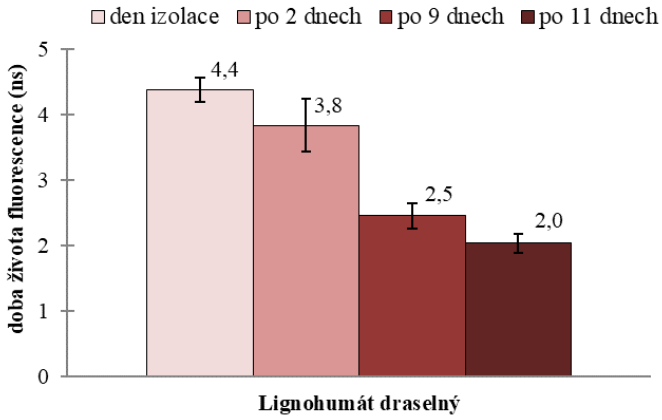
Z těchto distribučních křivek (Obr. 71) byly získány střední hodnoty dob života fluorescence, tedy doby setrvání částic v excitovaném stavu. Tyto střední hodnoty a jejich hodnoty nejistot jsou znázorněny v grafu (Obr. 72 vlevo). Stejným způsobem bylo provedeno vyhodnocení i pro kutikuly uchované v prostředí čisté vody (Obr. 72 vpravo). Z grafů je patrné, že doby života fluorescence částic v kutikulách dosahují po celý studovaný čas v rámci chyby stejných hodnot. Průměrná hodnota doby života fluorescence částic v adaxiálních kutikulách vystaveným vzdušnému prostředí po dobu 11 dnů odpovídá 4,2±0,2 ns a průměrná hodnota doby života fluorescence částic v adaxiálních kutikulách vystavených vodnému prostředí odpovídá 4,2±0,1 ns. Ze získaných výsledků je zřejmé,

že po 11 dnech nedochází k degradaci či změnám ve struktuře kutikul, ať už v prostředí vzduchu, tak vody.



Obr. 72 Vyhodnocení dob života fluorescence částic v adaxiálních kutikulách izolovaných chemickou metodou – prostředí vzduch (vlevo), voda (vpravo).

Poněkud odlišných výsledků bylo dosaženo pro prostředí zředěného lignohumátu draselného, jehož koncentrace odpovídala 0,01 hm. %. Při měření bylo zjištěno, že s časem dochází ke snižování hodnot dob života fluorescence částic v kutikulách (Obr. 73), což bylo potvrzeno rovněž snímky z FLIM přístroje, z nichž je patrné, že u kutikul s časem klesá intenzita fluorescence (Obr. 74). To znamená, že lignohumát draselný ovlivňuje autofluorescenci rostlinných kutikul. Dalším důležitým poznatkem je, že samotný LH podléhá rovněž autofluorescenci, která není tak intenzivní jako v případě rostlinných kutikul, avšak je jisté, že má vliv na excitaci, respektive emisi částic rostlinné kutikuly.



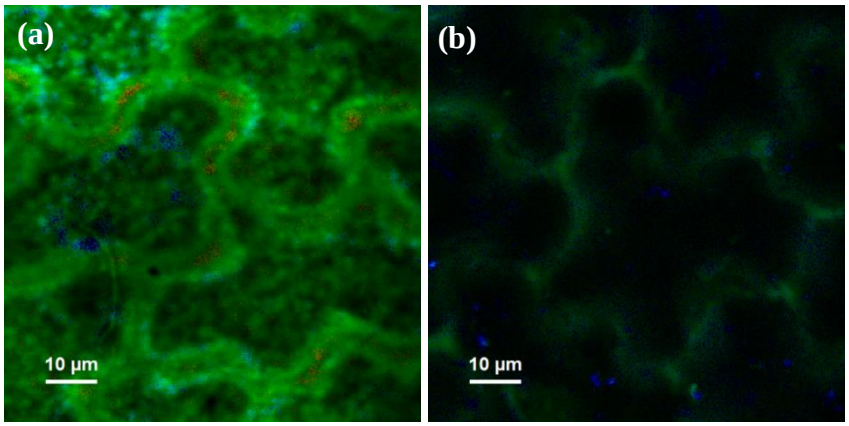
Obr. 73 Vyhodnocení dob života fluorescence pro adaxiální kutikuly izolované chemickou metodou – prostředí 0,01 hm. % vodný roztok lignohumátu draselného.

Klesající tendence dob života fluorescence (Obr. 73) je vysvětlena schopností lignohumátu draselného sorbovat (akumulovat) se na povrch rostlinných kutikul, což by vysvětlovalo i průběh difúzních experimentů v prvních dnech difúze, o tom více v kapitole 7.3. Adsorpce LH na povrchu kutikuly by bylo možné vysvětlit dvěma způsoby. Jedním z nich je, že rostlinné kutikuly jsou tvořeny z dlouhých řetězců mastných kyselin, glycerolů, ω-hydroxymastných kyselin aj. (kap. 2.7.2). Tedy jsou zde přítomny funkční skupiny (zejména –OH), které mohou přispívat k reakcím mezi povrchem kutikuly a LH, avšak těmto domněnkám není přikládán velký význam. Pravděpodobnější je, že celý proces se chová jako adsorpce na povrchu kutikul pomocí slabých vazebných interakcí (vodíkové můstky, van der Waalsovy síly).

V prvních 2 dnech nejsou totiž pozorovány žádné změny v dobách života fluorescence kutikul. V rámci chyby se v těchto dnech nic výrazného nedělo. Ovšem po 9 dnech působení roztoku LH byly

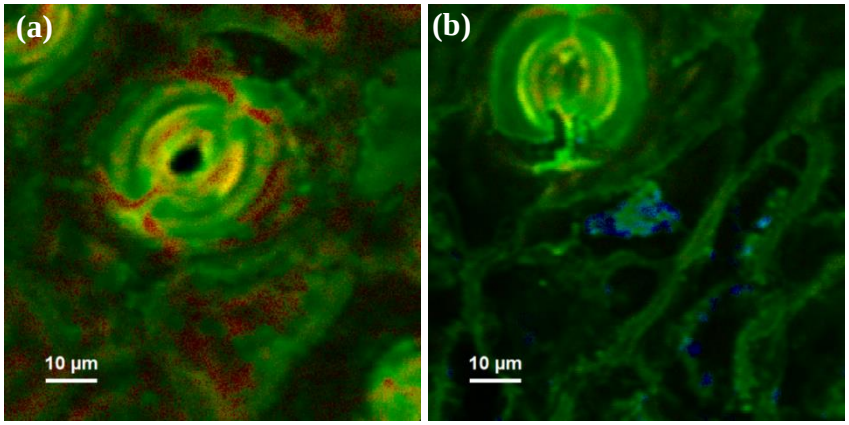
již pozorovány výrazné rozdíly, a to takové, že docházelo ke snížení dob života fluorescence 1,8krát. Následně byly proměřeny doby života fluorescence po 11 dnech působení roztoku LH a opět je možné si povšimnout, že nedocházelo k žádným výrazným změnám, což by mohlo znamenat, že došlo k úplnému obsazení povrchu kutikul molekulami lignohumátu draselného. To by souhlasilo i s klasickou teorií monomolekulové adsorpce pevná látka–kapalina.

Z Obr. 74 je možné vidět, jak dochází k poklesu intenzity fluorescence s časem. Zeleně zbarvený snímek (Obr. 74a) odpovídá době života fluorescence částic obsažených v kutikule po 2 dnech působení roztoku LH, jehož průměrná hodnota odpovídá 4,4±0,2 ns. Naopak snímky (Obr. 74b) znázorňující fluorescenci kutikul po 11 dnech jsou pohaslé a jejich střední hodnota doby života fluorescence kutikul odpovídá 2,0±0,1 ns.



Obr. 74 Snímky adaxiální kutikuly izolované chemickou metodou. Měření dob života fluorescence částic po 2 dnech od izolace kutikul a jejich luhování v 0,01 hm. % roztoku LH (a) a po 11 dnech od izolace (b).

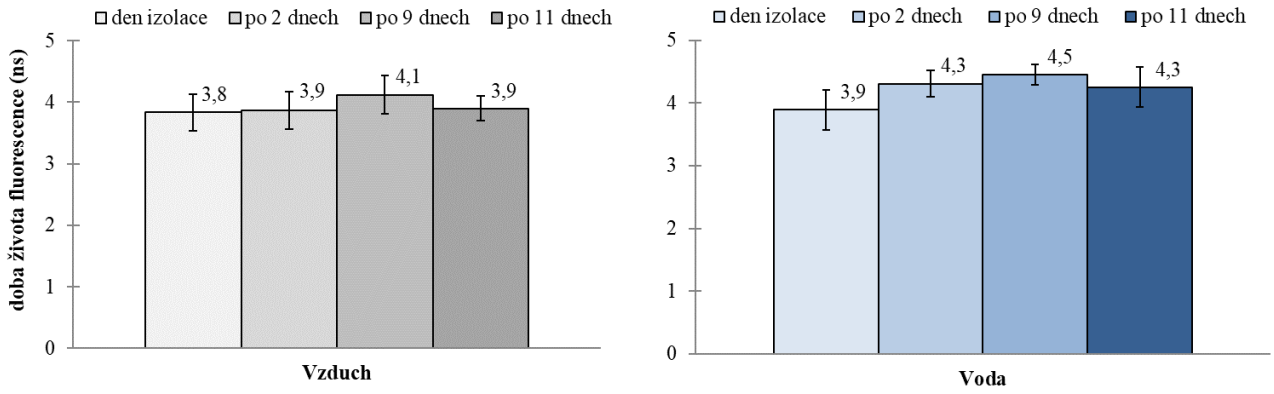
Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě abaxiálních kutikul izolovaných chemickou metodou. V první řadě byly provedeny experimenty pro prostředí voda a vzduch. Na Obr. 75 je znázorněna intenzita fluorescence kutikul, které byly vystaveny prostředí vzduchu. Po 2 respektive 11 dnech nedošlo k výrazné změně intenzity fluorescence. Rovněž byly stanoveny doby života fluorescence kutikul, jejichž střední hodnota odpovídala 3,9±0,1 ns. Z grafického znázornění (Obr. 76 vlevo) naměřených dat je patrné, že v rámci chyby kutikuly nevykazovaly po celou dobu měření žádné změny.



Obr. 75 Snímky abaxiální kutikuly izolované chemickou metodou. Měření dob života fluorescence kutikul v čase 0 (v den izolace) (a) a po 11 dnech (b) – prostředí vzduchu.

Stejně tak tomu bylo i v případě kutikul vystavených vodnému prostředí. Během celé doby realizace experimentu, nebyly patrné jakékoliv výrazné změny v dobách života fluorescence kutikul. Získané hodnoty byly vyneseny do grafu (Obr. 76 vpravo), z něhož je patrné, že hodnoty dob života

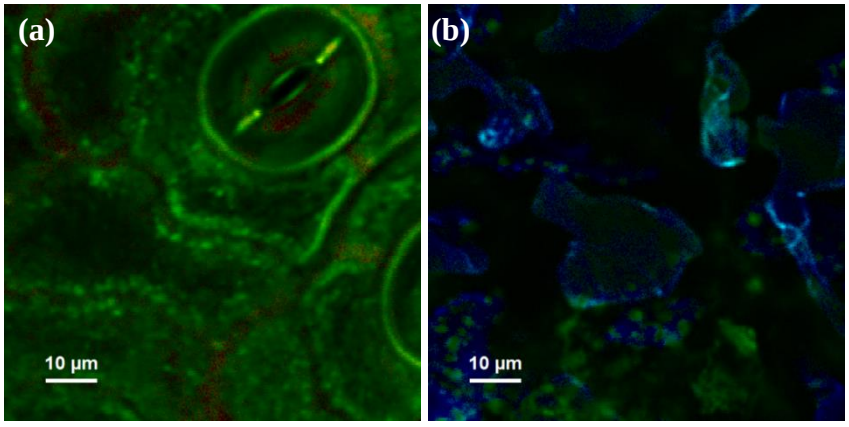
fluorescence částic jsou v rámci nejistoty shodné. Střední hodnota dob života fluorescence pro kutikuly vystavené vodnému prostředí odpovídala 4,3±0,3 ns.



Obr. 76 Vyhodnocení dob života fluorescence abaxiálních kutikul izolovaných chemickou metodou. Pro prostředí vzduch (vlevo) a voda (vpravo).

Porovnáním výsledků středních hodnot dob života fluorescence kutikul (abaxiálních i adaxiálních) vystavených prostředí vzduchu a vody je zřejmé, že kutikuly se v obou prostředích chovají totožně, tudíž tato prostředí nemají žádný vliv na strukturu či funkci rostlinných kutikul. Z těchto výsledků je možné usuzovat, že s časem nedochází v těchto prostředích k degradaci struktury kutikul či jiným změnám, které by mohly ovlivňovat simulace difúzních experimentů.

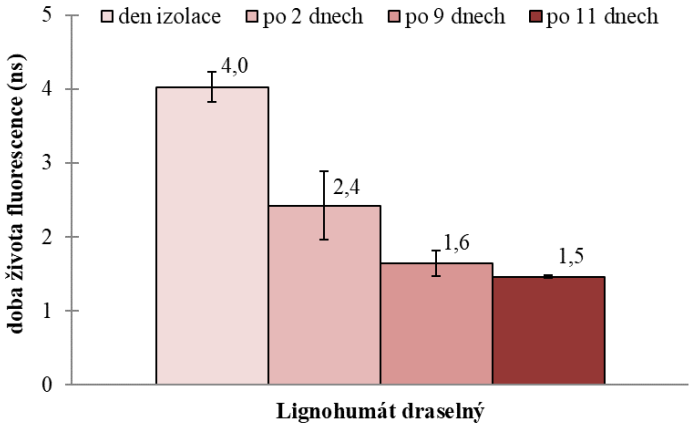
Adaxiální kutikuly byly rovněž vystaveny působení 0,01 hm. % lignohumátu draselného. I u těchto měření bylo možné pozorovat klesající trend dob života fluorescence kutikul s časem, což je zřejmé ze zachycených snímků kutikul během měření (Obr. 77), kde je možné pozorovat posun intenzity excitace částic od zelené (vyšší intenzita) k modré (nižší intenzita). Tento posun v dobách života fluorescence částic, respektive změně intenzity excitace částic je zřejmý i z grafu (Obr. 78), kde s časem dochází k poklesu dob života fluorescence flavonoidů obsažených v kutikulách rostlin.



Obr. 77 Snímky abaxiálních kutikul izolovaných chemickou metodou. Měření dob života fluorescence částic po 2 dnech od izolace kutikul a jejich luhování v 0,01 hm. % roztoku LH (a) a po 11 dnech od izolace (b).

Porovnáním výsledků měření dob života fluorescence provedených u abaxiálních a adaxiálních kutikul je zřejmé, že adaxiální kutikuly nepodléhají procesům zhášení tak rychle, jako kutikuly s obsahem stomat. Z uvedených hodnot bylo vypočteno, že abaxiální kutikuly podléhají procesům zhášení až 1,5krát více než adaxiální kutikuly. Je možné tedy usuzovat, že spodní kutikuly jsou schopny 1,5krát rychleji sorbovat LH, což může mít významný vliv při porovnávání difúzních experimentů realizovaných přes oba typy kutikul. Z dosavadních výsledků je patrné, že difúzní experimenty přes abaxiální kutikuly budou rychlejší než přes ty adaxiální.

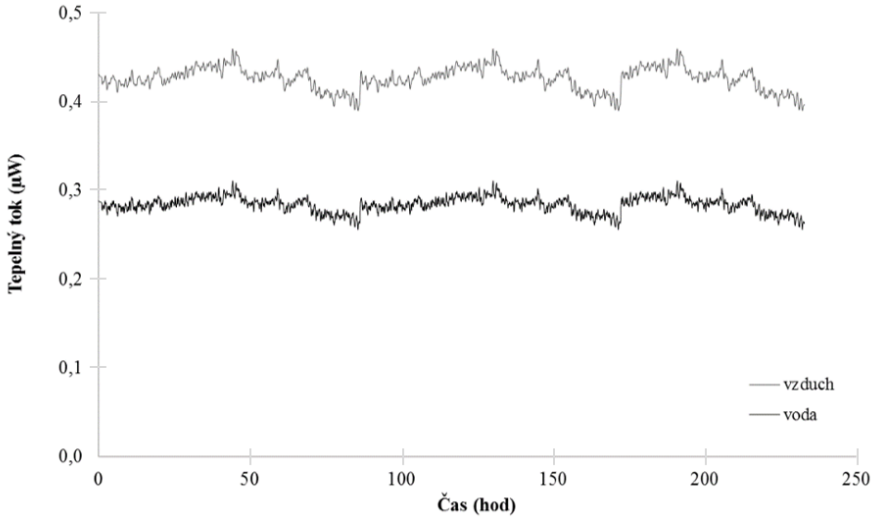
Otázkou ovšem je, zda naměřená data opravdu znamenají interakce nebo sorpce lignohumátu draselného na povrch kutikuly nebo zda se nejedná o růst mikroorganismů. Ty by se totiž rovněž podepsaly na snížení intenzity excitace flavonoidů v kutikule nebo by naopak mohlo dojít k jejich „přesvícení“ vlivem silné intenzity fluorescence bakterií. Z tohoto důvodu byla pro další studium využita metoda isotermální mikrokalorimetrie (kap. 7.1.7).



Obr. 78 Vyhodnocení dob života fluorescence pro abaxiální kutikuly izolované chemickou metodou v prostředí 0,01 hm. % vodného roztoku lignohumátu draselného.

7.1.7 Isotermální mikrokalorimetrie (IMC)

Rostlinné kutikuly byly podrobeny dalšímu měření na přístroji isotermální mikrokalorimetrie, která se využívá pro stanovení reakčních tepel izolovaného systému. Pevné vzorky izolovaných rostlinných kutikul byly studovány ve třech prostředích (vzduch, voda a LH), stejně jako při stanovování dob života fluorescence kutikul, které byly využity pro studium sorpce, respektive interakce LH na povrch kutikul. Isotermální mikrokalorimetrie je metoda založená na měření uvolněného, respektive spotřebovaného tepla v izolovaném systému při interakci 2 látek nebo při zjišťování změny stavu systému (degradace, tvorba bakterií atd.). Tato metoda byla využita za účelem studia sorpce lignohumátu draselného na povrch kutikuly a získání tak druhé metody pro objasnění, a hlavně srovnání sorpčních schopností kutikul.



Obr. 79 Závislost tepelného toku na čase pro adaxiální kutikulu izolovanou chemickou metodou v prostředí čisté vody a vzduchu.

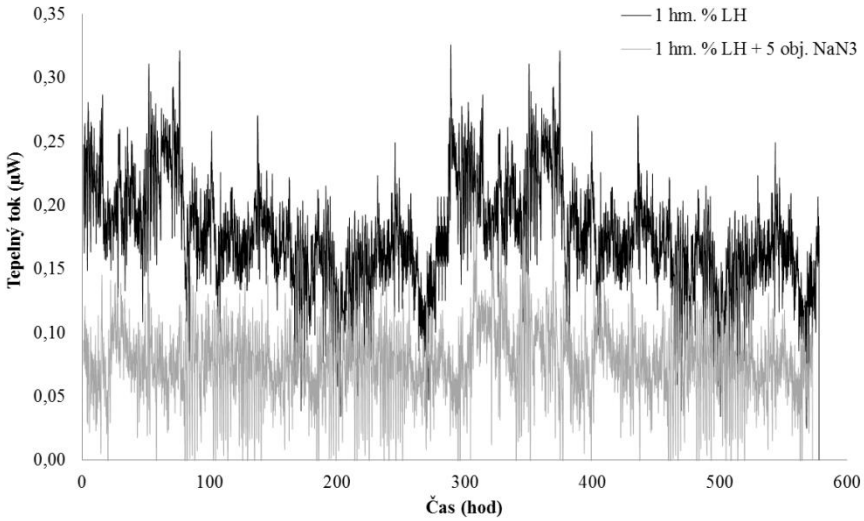
Počáteční experimenty byly realizovány pro adaxiální a abaxiální kutikuly, které byly vystaveny prostředí čisté vody a vzduchu. Tyto experimenty měly potvrdit, že rostlinná kutikula během doby

trvání transportních experimentů nepodléhá strukturním či jiným změnám, ani nedochází k růstu nežádoucích mikroorganismů. Graf (Obr. 79) znázorňuje závislost tepelného toku na čase pro adaxiální kutikulu izolovanou chemickou metodou, která byla vystavena právě vzdušnému a vodnému prostředí bez přídavku dezinfekční látky.

Křivky byly získány z průměru měření pro stejný druh vzorku a za stejných podmínek. Z grafu je patrné, že kutikuly v prostředí vzduchu i vody nevykazují žádných změn. Průběh měření má konstantní charakter, tedy je zřejmé, že kutikuly nepodléhají stárnutí, degradaci, ani nedochází k růstu mikroorganismů, neboť všechny tyto vlivy by se projevily v grafu vysokým zvýšením tepelného toku. Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě abaxiálních kutikul. Pro úplnost studie byla provedena měření pouze pro samotnou vodu a vodu obohacenou o 5 obj. % azidu sodného, který sloužil jako prostředek proti růstu bakterií. Také v tomto případě nebyly zjištěny žádné výkyvy tepelných toků, naopak naměřená křivka měla konstantní průběh.

Z této řady experimentů bylo potvrzeno, že kutikuly v prostředí vzduchu nebo vody po dobu až 250 hodin jsou stabilní a jejich funkce by neměla být ničím ovlivněna, tedy aspoň po dobu průběhu experimentů. Zároveň byla potvrzena i dosavadní měření z FLIM přístroje, který rovněž nevykazoval žádné známky změn během měření dob života fluorescence kutikul. Kutikuly tedy opravdu v těchto prostředích nevykazují sníženou funkci, která by ovlivnila difúzní experimenty.

Dalším bodem studia se stal 1 hm. % roztok LH, který byl nadávkován do kalorimetrické ampule a bylo provedeno měření za stejných podmínek jako měření s čistou vodou, respektive vzduchem. Z naměřených dat byl sestaven graf (Obr. 80) závislosti tepelného toku na čase a opět bylo zjištěno, že křivka tepelného toku má konstantní charakter. Stejné měření bylo provedeno rovněž pro roztok 1 hm. % LH v kombinaci s 5 obj. % azidu sodného, který neměl vliv na změnu průběhu křivky tepelného toku. Na základě těchto experimentů bylo ověřeno, že samotný roztok lignohumátu draselného nezpůsobuje navýšení tepelného toku experimentů při měřeních s kutikulami.



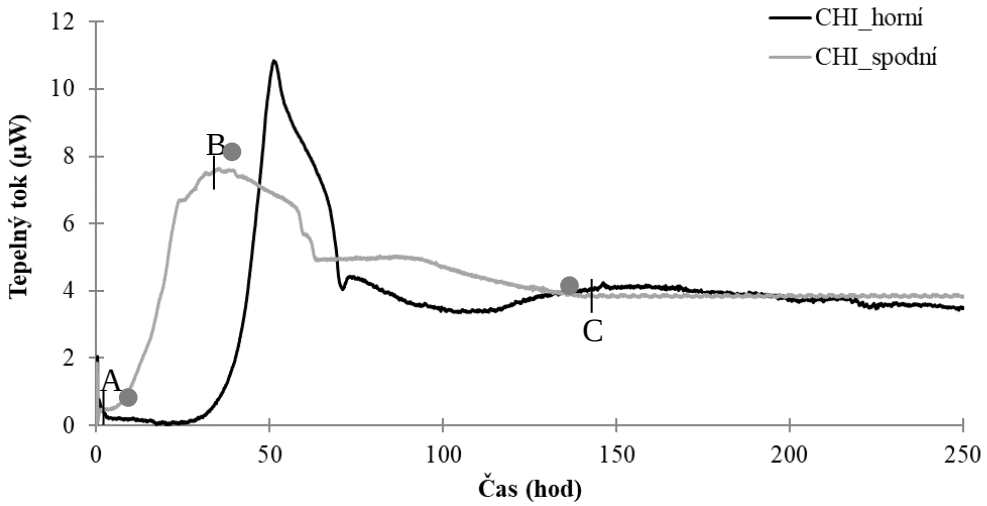
Obr. 80 Závislost tepelného toku na čase pro 1 hm. % LH a 1 hm. % LH s 5 obj. % NaN_3.

V následujících odstavcích budou popisovány jednotlivé experimenty uskutečněné pro adaxiální a abaxiální strany rostlinných kutikul izolovaných enzymatickou a chemickou metodou, které byly vystaveny působení 1 hm. % lignohumátu draselného, respektive jeho zředěným roztokům. Rovněž byla provedena měření v kombinaci kutikula, LH a azid sodný, aby bylo 100% ověřeno, že naměřená data nejsou ovlivněna nežádoucími vedlejšími vlivy.

Pro první měření byly využity adaxiální a abaxiální chemicky izolované kutikuly, které byly měřeny za izochorických a izotermických podmínek. Teplota byla nastavena na hodnotu 25 °C. Sestavením grafické závislosti tepelného toku na čase byl získán graf (Obr. 81), který měl podobný průběh jako

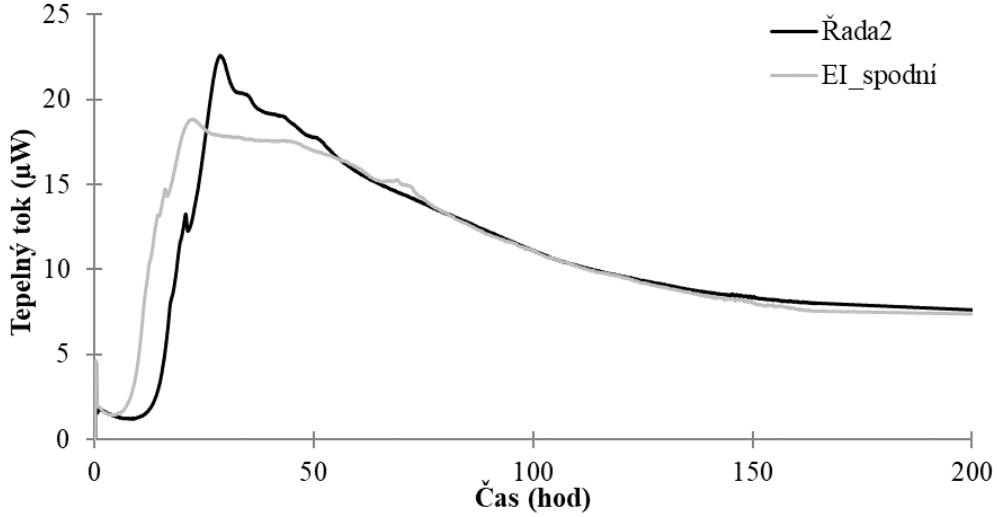
křivky uvedené v práci [178], ve které se autoři zabývali antimikrobiálními vlastnostmi berberínových alkaloidů v *Coptic chinesis* stanovovaných metodou mikrokalorimetrie.

Pro popis získaných křivek bylo využito poznatků z této publikace, v nichž se část A–B nazývá jako *exponenciální fáze*, část B–C je označována jako klesající fáze a za bodem C je určen konec experimentu, jehož křivka se již více nemění. Exponenciální část je úsek zvyšování tepelného toku, který zachycuje interakce mezi oběma studovanými materiály, tedy rostlinnou kutikulou a 1 hm. % roztokem LH. V bodě B je dosaženo maximální hodnoty tepelného toku, která značí úplné zreagování obou látek, respektive maximální možnou adsorpci lignohumátu draselného na povrchu rostlinné kutikuly. Tento děj je doprovázen uvolněním tepla, které se projevuje nárůstem tepelného toku.



Obr. 81 Závislost tepelného toku na čase pro chemicky izolované rostlinné kutikuly v prostředí 1 hm. % lignohumátu draselného při teplotě 25 °C.

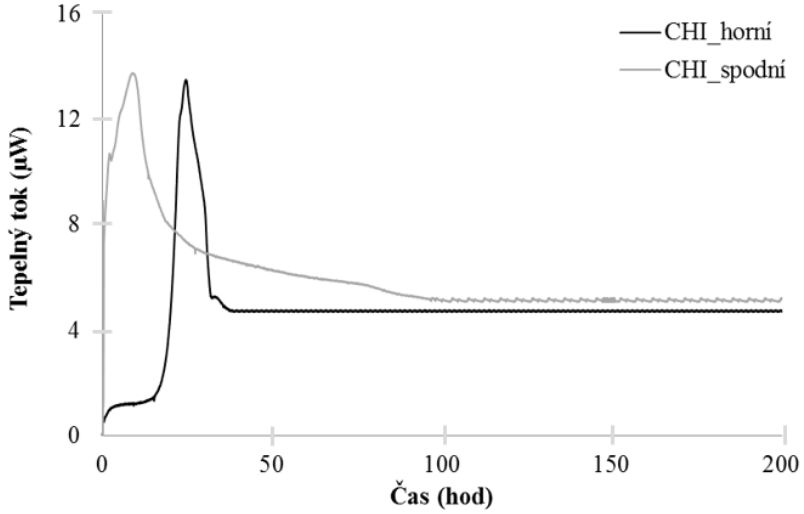
Křivky tepelných toků pro horní i spodní kutikulu mají podobný průběh, ale hodnoty maxim tepelných toků jsou vůči sobě časově posunuté. Spodní kutikula dosahuje maximální hodnoty tepelného toku 7,7 μW v čase 35 hodin a horní kutikula 11,9 μW v čase 66 hodin. Z grafu i získaných hodnot je zřejmé, že interakce (sorpce) mezi abaxiálními kutikulami a 1 hm. % roztokem lignohumátu draselného jsou téměř dvojnásobně rychlejší (přesně 1,9krát) než interakce probíhající mezi adaxiálními kutikulami a LH. Tento jev bude pravděpodobně zapříčiněný přítomností stomat na abaxiálních kutikulách a rovněž odlišným povrchem kutikul (kap. 7.1.3).



Obr. 82 Závislost tepelného toku na čase pro enzymaticky izolované rostlinné kutikuly v prostředí 1 hm. % lignohumátu draselného při teplotě 25 °C.

Stejná měření byla realizována rovněž pro enzymaticky izolované kutikuly pro adaxiální i abaxiální stranu. Z naměřených dat byla vynesena závislost tepelného toku na čase a výsledkem byly křivky zobrazené v grafu (Obr. 82). I v případě enzymaticky izolovaných kutikul bylo možné sledovat v prostředí 1 hm. % vodného roztoku LH termální aktivitu, která se projevila strmým nárůstem tepelného toku a dosažením jeho maxima.

Spodní kutikula dosáhla maximální hodnoty tepelného toku 18,8 μW po 22 hodinách a horní kutikula dosáhla maxima tepelného toku 22,6 μW po 29 hodinách. Z výsledků je patrné, že abaxiální kutikuly podléhaly sorpci LH rychleji než adaxiální kutikuly, avšak časový posun mezi jednotlivými vzorky není tak velký jako v případě chemicky izolovaných kutikul. To může být zapříčiněno odlišnými povrchy kutikul izolovaných jednotlivými metodami, o čemž pojednává kapitola 7.1.3, z níž je patrné, že enzymaticky izolované kutikuly neobsahují takové množství nerozpuštěných zbytků jako chemicky izolované kutikuly.

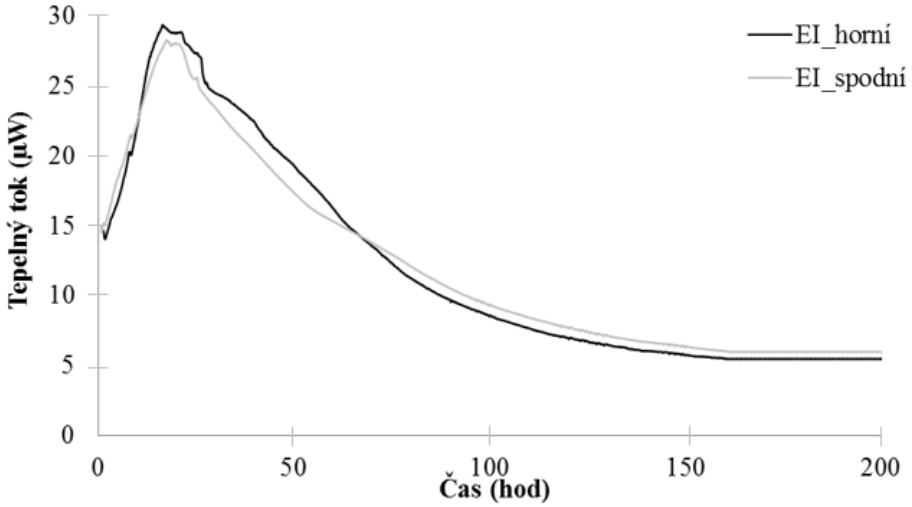


Obr. 83 Závislost tepelného toku na čase pro chemicky izolované rostlinné kutikuly v prostředí 1 hm. % lignohumátu draselného při teplotě 35 °C.

Následně byly chemicky i enzymaticky izolované rostlinné kutikuly proměřeny na IMC technice při izotermických podmínkách 35 °C. Při této teplotě byly realizovány i difúzní experimenty a bylo tedy důležité zjistit chování kutikul za těchto podmínek. Z grafu (Obr. 83) je zřejmé, že spodní chemicky izolované kutikuly dosahují maximální hodnoty tepelného toku rychleji než horní kutikuly. Spodní kutikula nabyla maximální hodnoty tepelného toku 13,8 μW po 9 hodinách a horní kutikula hodnoty 13,5 μW po 25 hodinách. Interakce (sorpce) LH na spodní kutikulu probíhá téměř 3krát rychleji (přesně 2,7krát) než v případě horní kutikuly. Porovnáním výsledků experimentů probíhajících při teplotě 25 °C je zřejmé, že zvýšení teploty způsobuje urychlení sorpce lignohumátu draselného na povrch rostlinných kutikul.

Výsledky získané z měření enzymaticky izolovaných kutikul (Obr. 84) ukázaly, že spodní i horní kutikuly dosahují obdobných výsledků. Tepelný tok spodní kutikuly nabýval hodnoty 28,2 μW, kterých bylo dosaženo po 17,5 hodinách a horní kutikula nabývala hodnoty tepelného toku 29,3 μW po době 16,5 hodin. V případě enzymaticky izolovaných kutikul dochází k procesu sorpce lignohumátu draselného stejnou měrou.

Na základě těchto měření je možné usoudit, že pro enzymaticky izolované kutikuly je optimální teplotou 35 °C, neboť při této teplotě se horní i spodní kutikuly chovají velmi podobně. Toto zjištění může být klíčové pro realizaci a správné nastavení difúzních experimentů.



Obr. 84 Závislost tepelného toku na čase pro chemicky izolované rostlinné kutikuly v prostředí 1 hm. % lignohumátu draselného při teplotě 35 °C.

Výsledky z měření izotermální mikrokalorimetrie jsou uvedeny v Tab. 15, kde je možné porovnat číselné hodnoty jednotlivých měření.

Tab. 15 Souhrn výsledků získaných z IMC techniky pro adaxiální i abaxiální kutikuly izolované chemickou a enzymtickou metodou.

		Chemická izolace		**Enzymatická metoda**	
		tepelný tok (µW)	**čas (hod)**	**tepelný tok (µW)**	**čas (hod)**
25 °C	**adaxiální**	11,9	66	22,6	29
	abaxiální	7,7	35	18,8	22
35 °C	**adaxiální**	13,5	25	29,3	16,5
	abaxiální	13,8	9	28,2	17,5

Z naměřených dat byla vypočtena rychlostní konstanta interakce (respektive sorpce) LH na povrch rostlinné kutikuly pro daný experiment. Výpočet byl proveden na základě dostupných informací z publikace [178]. Zde byla rychlostní konstanta vypočtena dle vztahu $kt = \ln(P_t/P_0)$, kde k je rychlostní konstanta daného procesu, P_0 reprezentuje tepelný tok na začátku experimentu, P_t reprezentuje tepelný tok v čase t (odpovídá maximální hodnotě tepelného toku) a t značí čas dosažení maxima tepelného toku. Vypočtené hodnoty byly zapsány do tabulky (Tab. 16).

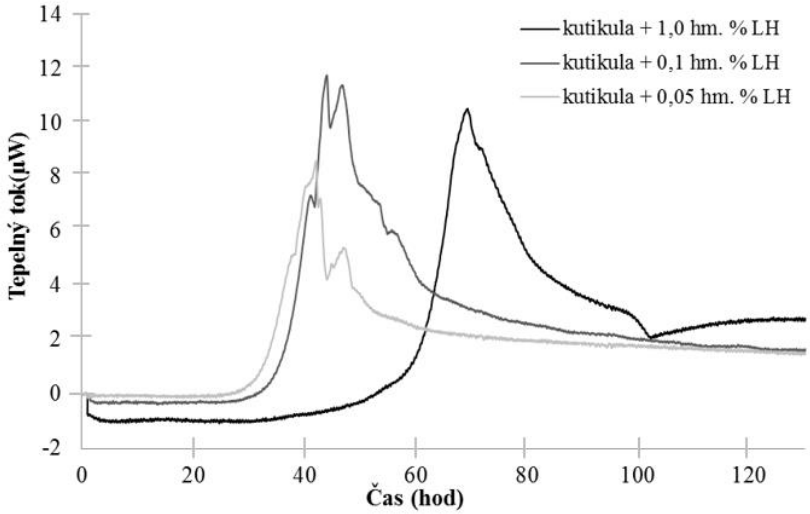
Tab. 16 Souhrn hodnot rychlostních konstant pro jednotlivá měření.

	25 °C		**35 °C**	
	abaxiální	**adaxiální**	**abaxiální**	**adaxiální**
k_{CHI} **(hod^{-1})**	0,205	0,121	0,466	0,131
k_{EI} **(hod^{-1})**	0,476	0,263	0,319	0,301

Vypočtené hodnoty rychlostních konstant korespondují s dosavadními závěry těchto měření. Z výsledků je zřejmé, že míra sorpce LH na povrch rostlinných kutikul probíhá rychleji v případě abaxiálních kutikul než adaxiálních, což platilo pro oba typy experimentů uskutečněných při teplotě 25 a 35 °C. Dále bylo prokázáno, že při teplotě 25 °C probíhají rychleji sorpce v případě enzymaticky izolovaných kutikul než chemicky izolovaných. V případě experimentů probíhajících při teplotě 35 °C nebylo dosaženo stejných výsledků, pouze došlo k potvrzení dosavadních závěrů, že enzymaticky izolované kutikuly se při této teplotě chovají velmi podobně, tudíž sorpce LH na povrchu abaxiální i adaxiální kutikuly probíhá velmi podobnou měrou, což může mít dopad na difúzní experimenty.

Sorpce lignohumátu draselného na povrch rostlinných kutikul byly studovány rovněž v závislosti na různé koncentraci LH (1, 0,1 a 0,05 hm. %) (Obr. 85). Smyslem měření bylo, jak budou maxima píků tepelných toků mezi sebou posunuta a jestli se potvrdí předpoklad, že čím nižší koncentrace, tím rychlejší dosažení maxima tepelného toku, respektive rychlejší sorpce.

Z uvedeného grafu (Obr. 85) je zřejmé, že se snižující se koncentrací LH dochází k posunu maxima píku tepelného toku, tedy čím nižší koncentrace, tím dříve interakce (respektive sorpce) na kutikulách probíhá. Kutikuly v prostředí 0,05 hm. % LH dosáhly maxima tepelného toku 8,6 µW po 42,2 hodinách. Kutikuly v prostředí 0,1 hm. % LH dosáhly dvou dominantních píků, z jejichž průměrných hodnot byla vypočtena výsledná hodnota maxima tepelného toku, které nabývalo hodnoty 11,6 µW po 45,5 hodinách. Kutikuly vystavené prostředí 1 hm. % LH dosáhly maxima tepelného toku 10,5 µW po 69,4 hodinách.



Obr. 85 Závislost tepelného toku na čase pro chemicky izolované adaxiální kutikuly pro teplotu 25 °C a koncentrace lignohumátu draselného 1, 0,1 a 0,05 hm. %.

Pro přehlednost byly výsledky zapsány do tabulky (Tab. 17), kde je opět možné posoudit naměřené hodnoty. Rovněž jsou zde uvedeny hodnoty rychlostních konstant jednotlivých křivek tepelných toků, z nichž je zřejmé, že čím nižší koncentrace lignohumátu draselného, tím vyšší hodnota rychlostní konstanty, tedy tím rychleji sorpce na kutikule probíhá.

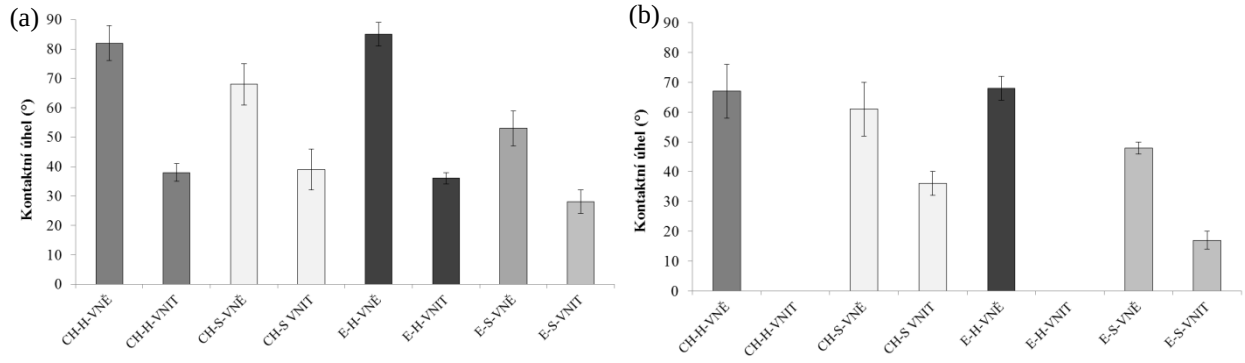
Tab. 17 Souhrn výsledků získaných z IMC techniky pro adaxiální kutikuly izolované chemickou metodou.

	0,05 hm. % LH	**0,1 hm. % LH**	**1,0 hm. % LH**
Tepelný tok (µW)	8,6	11,6	10,5
Čas maxima (hod)	42,2	45,5	69,4
Rychlostní konstanta (hod^{-1})	0,201	0,129	0,109

7.1.8 Smáčivost povrchu rostlinných kutikul

Rostlinné kutikuly byly proměřeny na přístroji Contact Angle System OCA, kterým byla stanovena smáčivost povrchu rostlinných kutikul pro čistou vodu a pro 1 hm. % roztok lignohumátu draselného. Cílem tohoto měření bylo zjistit, jestli roztok LH bude mít vliv na smáčivost rostlinné kutikuly nebo jestli se bude chovat stejně jako voda. Pokud by se prokázalo, že roztok LH ovlivňuje smáčivost rostlinných kutikul, pak by tento fakt mohl mít výrazný vliv i na penetrační schopnosti lignohumátu draselného skrze rostlinné kutikuly.

Data získaná z měření kontaktních úhlů byla vynesena do grafů (Obr. 86). Z uvedených hodnot je patrné, že vnější strany rostlinných kutikul bez ohledu na typ metody izolace dosahují větších hodnot kontaktních úhlů než jejich vnitřní strany. To znamená, že vnější strany kutikul mají horší smáčecí schopnosti, což je dáno chemickou strukturou rostlinných kutikul. Vnější strana je více lipofilní než vnitřní strana, protože při izolaci kutikul nedochází k dokonalému odstranění hydrofilních složek, zejména polysacharidů, které jsou součástí mezofylu. Tyto neodstraněné složky byly pozorovány na rastrovacím elektronovém mikroskopu a výsledky z měření jsou uvedeny v kapitole 7.1.3.



Obr. 86 Grafické znázornění výsledků kontaktních úhlů pro jednotlivé vzorky kutikul. CH (chemická izolace), E (enzymatická izolace, H (horní/adaxiální), S (spodní/abaxiální), VNIT (strana odstraňování mezofylu) a VNĚ (kutikula/vzduch). Souhrn výsledků pro prostředí vody (a) a 1 hm. % lignohumátu draselného (b).

Graf (Obr. 86a) znázorňuje výsledky kontaktních úhlů pro čistou vodu. Z výsledků je zřejmé, že chemicky i enzymaticky izolované kutikuly se chovají velmi podobně, vnější strany kutikul dosahují vyšších kontaktních úhlů, než je tomu v případě vnitřních stran. Největších rozdílů je pozorováno v případě abaxiálních stran enzymaticky izolovaných kutikul (vzorek E-S-VNIT), kde došlo k výraznému poklesu kontaktního úhlu oproti ostatním vzorkům. To je způsobeno velkým množstvím polysacharidů, které nebyly při izolaci rozpuštěny a odstraněny z povrchu membrány.

Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě měření kontaktních úhlů pro 1 hm. % roztok LH (Obr. 86b). Vnější strany kutikul opět dosahovaly vyšších hodnot kontaktních úhlů než vnitřní strany kutikul, což je opět dáno hydrofilní povahou těchto vnitřních stran kutikul. Z uvedených výsledků

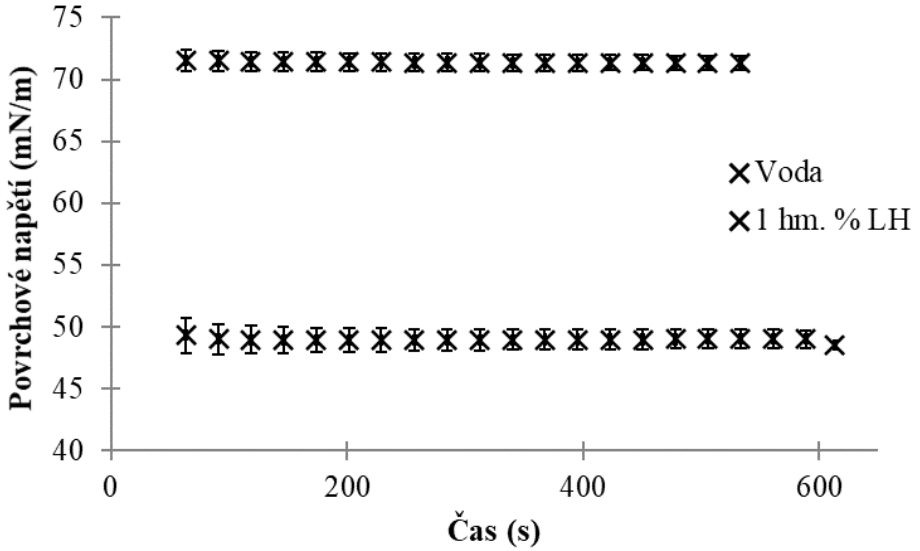
(Obr. 86,) je patrné, že roztok lignohumátu draselného dosahoval nižších hodnot kontaktních úhlů ve srovnání s kontaktními úhly naměřenými pro vodu. Z toho plyne, že roztok lignohumátu draselného se více rozestírá po povrchu kutikul než destilovaná voda.

V grafu (Obr. 86 b) a v tabulce (Tab. 18) nejsou zaznamenány hodnoty kontaktních úhlů horních kutikul izolovaných chemickou i enzymatickou metodou, z jejich vnitřní strany. Tyto hodnoty nebylo možné naměřit kvůli velmi rychlému rozestírání kapaliny po povrchu kutikul, které bylo opět způsobeno hydrofilními složkami na povrchu vnitřní strany kutikuly. Proč obdobných výsledků nebylo pozorováno i v případě abaxiálních kutikul je ten, že stomata přítomná v těchto kutikulách umožňují lepší průnik izolačního roztoku do struktury listu, a tudíž lepšího odstranění složek mezofylu, čímž jeho zbylé hydrofilní složky nepřispívají takovou měrou ke smáčení povrchu kutikul.

Tab. 18 Průměrné hodnoty kontaktních úhlů pro abaxiální a adaxiální kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou, pro jejich vnější a vnitřní strany, a použité prostředí destilované vody a 1 hm. % roztoku lignohumátu draselného.

	Kontaktní úhly (°)							
	CH-H vně	**CH-H vnit**	**CH-S vně**	**CH-S vnit**	**E-H vně**	**E-H vnit**	**E-S vně**	**E-S vnit**
voda	82±6	38±3	68±7	39±7	85±4	36±2	53±6	28±4
LH	67±9	–	61±9	36±4	68±4	–	48±2	17±3

Pro ověření dosavadních závěrů ze smáčivosti povrchu rostlinných kutikul, bylo provedeno měření na tenziometru. Zde byla proměřena jak destilovaná voda, tak 1 hm. % roztok lignohumátu draselného. Tímto přístrojem bylo zjištěno povrchové napětí obou roztoků. Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu (Obr. 87), z něhož je zřejmé, že destilovaná voda dosahuje vyšších hodnot povrchového napětí (71,39±0,06 mN/m) než 1 hm. % roztok LH (48,97±0,13 mN/m). Z těchto výsledků vyplývá, že roztok LH má menší povrchové napětí, tudíž lépe smáčí povrch kutikul.



Obr. 87 Výsledky z měření povrchového napětí roztoků v závislosti na čase pro destilovanou vodu a roztok 1 hm. % lignohumátu draselného.

7.2 Charakterizace hydrogelových matric a komerčních produktů

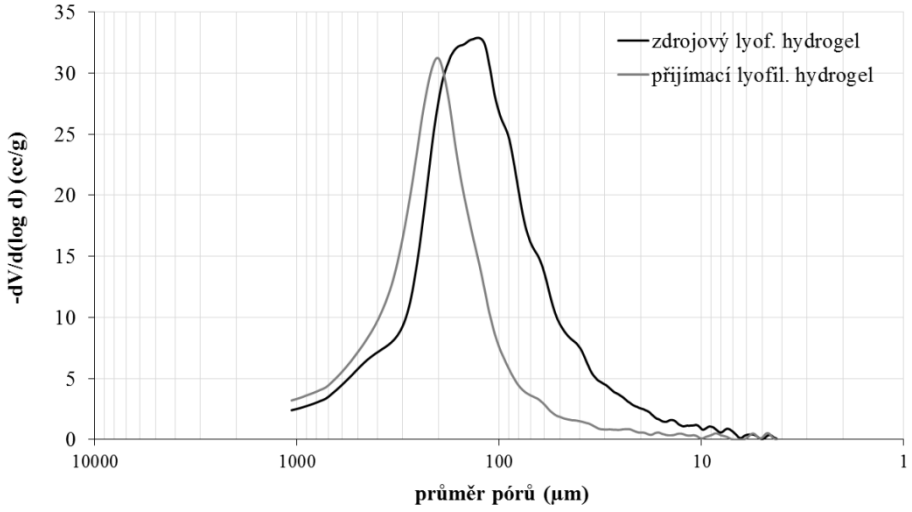
Transportní experimenty byly realizovány přes agarosové hydrogely, které byly rovněž charakterizovány některými fyzikálně-chemickými metodami. Zejména byly u hydrogelů studovány jejich visko-elastické vlastnosti a jejich pórovitost, která byla studována na lyofilizovaných vzorcích hydrogelů.

Pro simulace foliárního hnojení v laboratorním měřítku byl využit pouze přípravek lignohumátu draselného (Lignohumát A), avšak pro inkubační experimenty byly využity také další komerční přípravky firmy Amagro s.r.o. (lignohumát AM a Ligno Aktivátor), proto byly také podrobeny stejným charakterizacím. Měření byla zaměřena zejména na studium jejich vnější struktury, pH a elektrické vodivosti.

7.2.1 Charakterizace lyofilizovaných hydrogelů rtuťovou porozimetrií

Rtuťová porozimetrie je schopná měřit vzorky ve vysušeném stavu, proto byly před měřením lyofilizovány hydrogely s obsahem 1 hm. % agarózy (přijímací) a hydrogely s obsahem 1 hm. % agarózy a 1 hm. % lignohumátu draselného (zdrojová). Suché a tuhé porézní pěny byly poté změřeny na rtuťové porozimetrii, kterou byla získána distribuce velikosti pórů. Předpokladem je, že při přípravě fyzikálně síťovaných gelů dochází ke vzniku téměř identických materiálů, tedy jejich sítě jsou stejně husté a vnitřní póry stejně veliké. Avšak pokud by byl prokázán významný rozdíl mezi jednotlivými vzorky lyofilizovaných gelů, mohlo by to mít významný vliv na difúzní experimenty.

Výsledky rtuťové porozimetrie jsou znázorněny v grafu (Obr. 88), z něhož je zřejmé, že velikost pórů u obou materiálů je řádově stejná. Čistý lyofilizovaný vzorek dosahuje maxima distribuční křivky velikosti pórů v hodnotě 126 μm a zdrojový lyofilizovaný hydrogel v hodnotě 202 μm. Tyto hodnoty jsou ovšem 350krát vyšší než výsledky získané z měření UV-VIS spektrometrie, které byly provedeny v práci [183], kde velikost pórů v hydrogelech s obsahem 1 hm. % agarózy nabývala hodnoty 0,38 μm. Tento rozdíl může být způsoben tím, že UV-VIS spektrometrií byl měřen hydrogel, kdežto rtuťovou porozimetrií byl měřen vysušený gel.



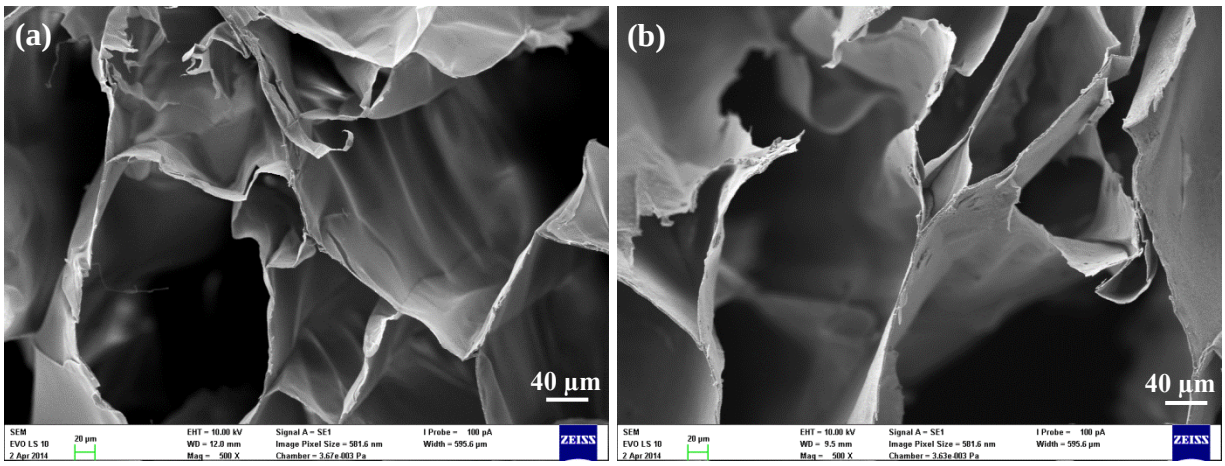
Obr. 88 Distribuční křivka velikosti pórů lyofilizovaných vzorků hydrogelů, přijímací lyofilizovaný hydrogel a zdrojový lyofilizovaný hydrogel.

Tento nesoulad výsledků je dán tím, že rtuťová porozimetrie je založena na principu Laplacovy rovnice, která stanovuje velikost pórů nacházejících se pouze na okraji vzorku. Tedy vtlačovaná rtuť do vzorku se dostává pouze do vstupní části póru nikoli do celé cesty póru. Lyofilizované vzorky hydrogelů jsou ale velmi křehké, a proto při jejich řezání na menší díly mohlo dojít ke zvětšení pórů na okrajích a tím mohlo dojít k výraznému ovlivnění výsledků měření. Dalším předpokladem je, že

lyofilizace nebude nejvhodnější metodou pro vysušování hydrogelů, neboť způsobuje vznik podlouhlých otvorů vlivem odpařování vody ze vzorku. Stejného závěru bylo dosaženo i v rámci projektu [184].

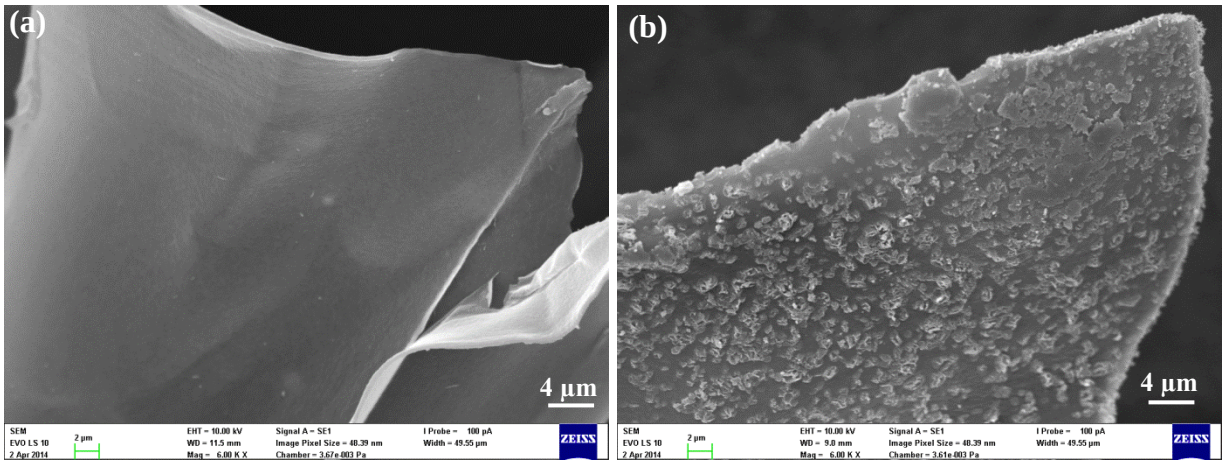
7.2.2 Rastrovací elektronová mikroskopie lyofilizovaných hydrogelů

Rastrovací elektronová mikroskopie byla využita pro zjištění velikosti pórů, vnitřní struktury a povrchu lyofilizovaných vzorků hydrogelů. Ze snímku (Obr. 89) je však patrné, že póry jsou nepravidelné a poničené. To mohlo být opět způsobeno manipulací se vzorkem a hlavně lyofilizací, proto ani u SEM metody nebude brán velký důraz na stanovené velikosti pórů, ale určitě je to zajímavým tématem pro další výzkum.



Obr. 89 Snímky lyofilizovaných hydrogelů při 500× větším zvětšení. Vzorek přijímacího xerogelu (a) a pro zdrojový xerogel(b).

Ovšem rastrovací elektronová mikroskopie je vhodná metoda pro posouzení povrchů studovaných materiálů. Výsledkem měření byly snímky na Obr. 90, z nichž je patrné, že xerogely tvořené pouze agarózou (Obr. 90a) mají povrch hladký, jejich struktura připomíná papír. Naopak v případě xerogelů s obsahem lignohumátu draselného (Obr. 90b) je patrné, že jejich povrch je zdrsněný, což je způsobeno solemi lignohumátu draselného. Tyto malé rozdíly mezi oběma xerogely s největší pravděpodobností nehrají roli v transportních experimentech.

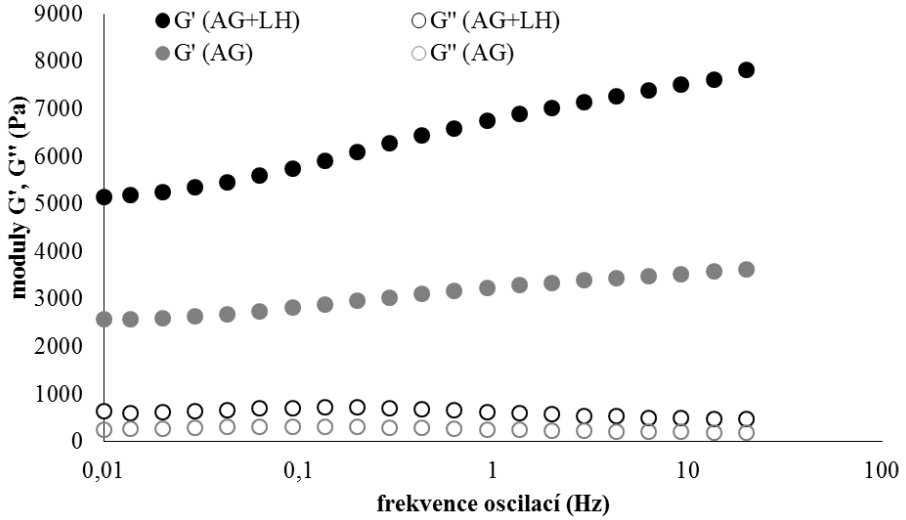


Obr. 90 Snímek lyofilizovaných hydrogelů s 6 000× zvětšením. Přijímací xerogel (a) a zdrojový xerogel (b).

7.2.3 Reologie hydrogelů

Oba typy hydrogelů byly studovány z hlediska visko-elastických vlastností, které byly proměřeny na reometru. Pokud by se ukázalo, že přijímací hydrogely by měly rigidnější strukturu než zdrojové hydrogely, potom by mohlo dojít k výraznému ovlivnění difúzních experimentů, (zpomalení nebo naopak zrychlení transportního procesu). Mechanické vlastnosti hydrogelů byly posuzovány na základě hodnot modulů G‘ (elastický neboli paměťový modul) a G“ (viskózní neboli ztrátový modul).

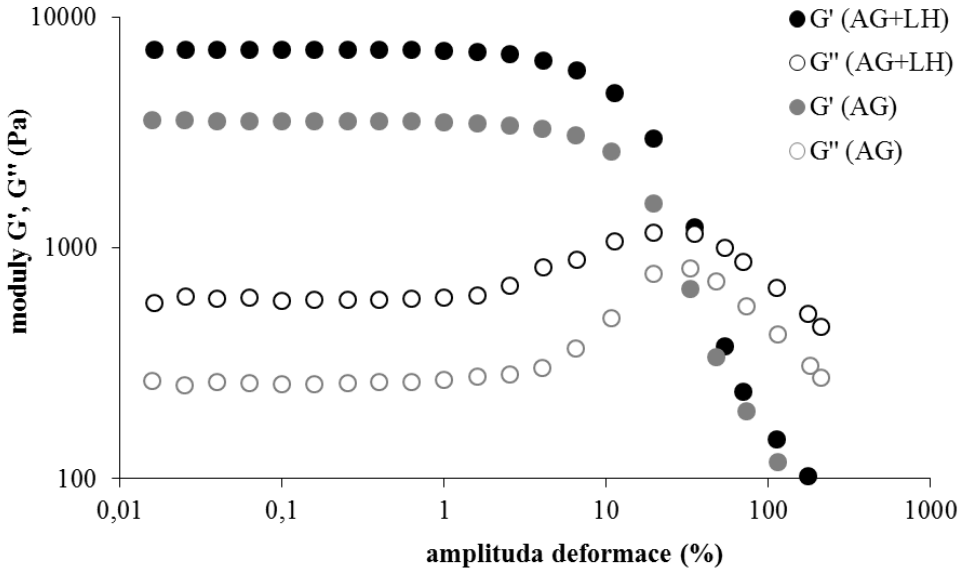
Z oscilačně frekvenčních testů (Obr. 91) je zřejmé, že u obou studovaných hydrogelů převládá elastický modul G‘ nad viskózním modulem G“. Z toho plyne, že hydrogelové matrice obojího typu vykazují chování elastických tuhých materiálů. Zajímavý je rozdíl v hodnotách elastického modulu pro studované vzorky hydrogelů. Pro přijímací hydrogel (čistý hydrogel) je rozdíl v modulech určen hodnotou 3 000 Pa, pro agarózové hydrogely s příměsí 1 hm. % lignohumátu draselného odpovídá tato hodnota 6 000 Pa. Z těchto hodnot lze usuzovat, že zdrojové hydrogely s příměsí LH mají tužší strukturu než čistý hydrogel, z čehož plyne, že lignohumát draselný ovlivňuje mechanické vlastnosti hydrogelů. Vzhledem k tomu, že realizované difúzní experimenty jsou založeny pouze na měření změny koncentrace lignohumátu v přijímcím (čistém) hydrogelu, rozdíly ve visko-elastických vlastnostech agarózového gelu s LH a čistého agarózového hydrogelu nemají vliv na finální transportní vlastnosti lignohumátu.



Obr. 91 Frekvenční test. Závislost visko-elastických modulů na frekvenci oscilací. G‘ je elastický modul, G‘‘ je viskózní modul.

Oscilační deformační test (Obr. 92) je založen na změně amplitudy deformace při konstantní frekvenci oscilací 1 Hz. Z uvedeného grafu je patrné, že agarózové hydrogelové matrice jsou schopny odolávat působícímu napětí. To znamená, pokud na vzorek působí definovaná síla *F*, potom dochází ke deformaci vzorku, avšak přestane-li tato síla dále na vzorek působit, vzorek se vrátí do původního stavu. Takové materiály nazýváme jako elastická tuhá tělesa a v grafu se projevují tak, že visko-elastické moduly G‘ a G“ jsou nezávislé na amplitudě deformace.

Zdrojový hydrogel s přídavkem LH má lineární visko-elastickou oblast v rozmezí 0,01–4 % amplitudy deformace, zatímco přijímací hydrogel bez příměsi LH má lineární visko-elastickou oblast v rozmezí 0,01–1 %. Z toho plyne, že na základě oscilačního deformačního testu má tužší strukturu opět zdrojový hydrogel s obsahem lignohumátu draselného.



Obr. 92 Deformační test. Závislost visko-elastických modulů na amplitudě deformace. G‘ je elastický, G“ je viskózní modul.

Oscilačně frekvenční testy prokázaly, že lignohumát draselný ovlivňuje rigiditu hydrogelů, to kvůli vyšší elasticitě. Oscilační deformační testy prokázaly, že síla vazby jednotlivých uzlů je větší pro zdrojový hydrogel (s přídavkem LH) ve srovnání s přijímacími čistými hydrogely. V obou případech testů elastické moduly převyšovaly ty viskózní v celém rozsahu měřených frekvencí oscilace.

7.2.4 Obecná charakteristika lignohumátu draselného

Pro posouzení jednoduchých vlastností Lignohumátu A, který byl využit pro laboratorní difúzní experimenty, bylo provedeno měření pH a elektrické vodivosti. Pro měření byl využit roztok 1 hm. % LH, který byl reálně použit pro simulace foliárního hnojení. Výsledky z těchto základních charakteristik jsou uvedeny v tabulce (Tab. 19).

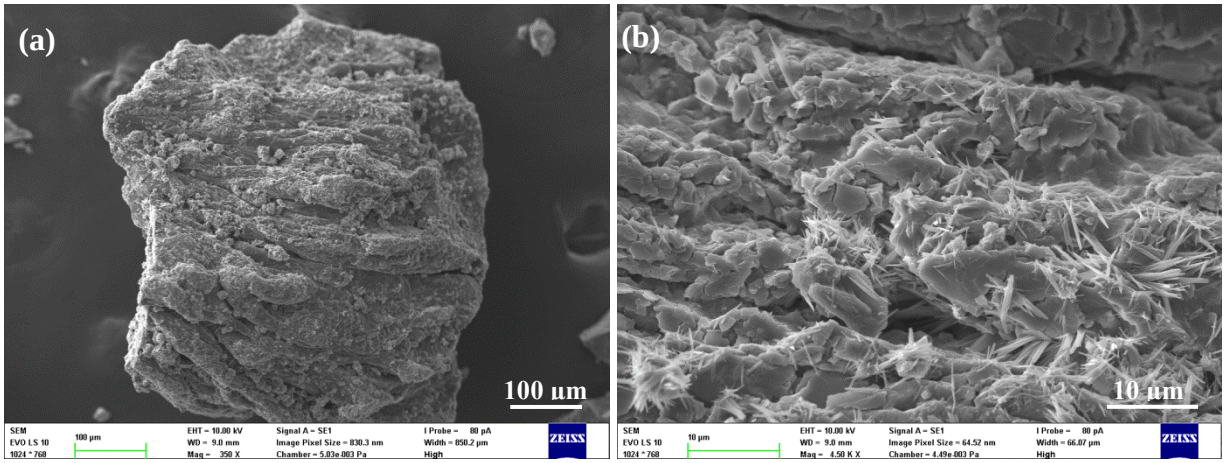
Tab. 19 Přehled fyzikálních vlastností pro lignohumát draselný.

	Lignohumát A
pH	9,49±0,04
el. vodivost (µS/cm)	5,32±0,02

Z naměřených hodnot pH 9,49±0,04 je patrné, že LH patří k mírně zásaditým přípravkům. Jeho hodnoty elektrické vodivosti se pohybují okolo 5,32±0,02 µS/cm, která je dle Vyhlášky Ministerstva zemědělství o stanovení požadavků na hnojiva č. 474/2000 Sb. [184] v normě. Množství iontů dodávaných do půdy je hlídáno z důvodu přesolování půd a ničení životního prostředí.

7.2.5 Rastrovací elektronová mikroskopie Lignohumátu A

Lignohumát draselný byl také nasnímán pomocí rastrovací elektronové mikroskopie, čímž byla zjištěna jeho struktura a stejně tak i povrch. Lignohumát draselný má tvar nepravidelných malých klastrů (Obr. 93a) a povrch je tvořen tenkými jehličkami draselné soli (Obr. 93b).



Obr. 93 Snímky lignohumátu draselného (Lignohumát A). Celá struktura při zvětšení 350× (a) a detailní zvětšení LH při 4 500násobném zvětšení (b).

7.3 Difúzní experimenty

Simulace foliárního hnojení byla realizována v laboratorním měřítku jednoduchými difúzními metodami. Cílem těchto experimentů je matematicky stanovit penetraci aplikovaných komerčních přípravků skrze rostlinné kutikuly. Do budoucna bude možné propojit tyto poznatky s reálnými skleníkovými experimenty, jejichž cílem bude posoudit vhodnost použité koncentrace přípravku, která by měla být prospěšná pro rostliny a zároveň šetrná k životnímu prostředí.

Transport LH skrze rostlinné kutikuly byl realizován dvěma modely, modelem nestacionární difúze tzv. difúze z roztoku a modelem nestacionární difúze tzv. difúzní pár rozdělený rostlinnou kutikulou. Metoda nestacionární difúze je založena na dvou agarózových hydrogelech, přijímacím a zdrojovém. Přijímací hydrogel je tvořen pouze 1 hm. % agarózy a zdrojový hydrogel obsahuje příměs 1 hm. % lignohumátu draselného (Lignohumát A). V přijímacím hydrogelu jsou v závislosti na čase měřena UV-VIS spektra, z nichž byly vypočteny difúzní parametry. Tyto experimenty byly realizovány při třech teplotách 25, 35 a 45 °C.

Model difúze z roztoku je založen na přípravě přijímacích hydrogelů, na něž jsou upevněny rostlinné kutikuly a tyto matrice jsou ponořeny do roztoku 1 hm. % lignohumátu draselného. V přijímacím hydrogelu byla opět měřena UV-VIS spektra v závislosti na čase a ze získaných dat byly stanoveny parametry difúze.

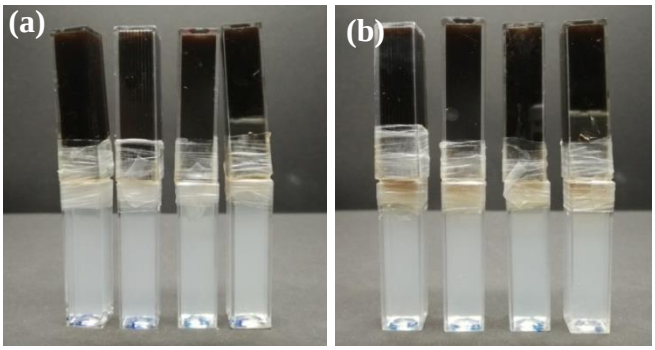
Hydrogelové materiály byly využity z důvodu jejich specifických vlastností. V hydrogelových materiálech není difúzní tok rušen tepelnou a mechanickou konvencí, jako tomu je v případě kapalných roztoků. Navíc, mohou být připraveny vzorky hydrogelů požadovaný tvarů a rozměrů, díky čemuž je možné difúzní tok správně kvantifikovat difúzními parametry, jako je efektivní difúzní koeficient.

7.3.1 Vizuální zhodnocení transportních experimentů (nestacionární difúze)

Lignohumát draselný je jemný, hnědý prášek dobře rozpustný ve vodě. Díky svému zabarvení bylo možné transportní experimenty nejdříve posuzovat vizuálně a až poté kvantifikovat UV-VIS spektrometrií. Vzhledem k odlišným metodám izolace rostlinných kutikul a jiné struktuře abaxiálních a adaxiálních kutikul bylo předpokládáno, že se kutikuly budou chovat odlišně.

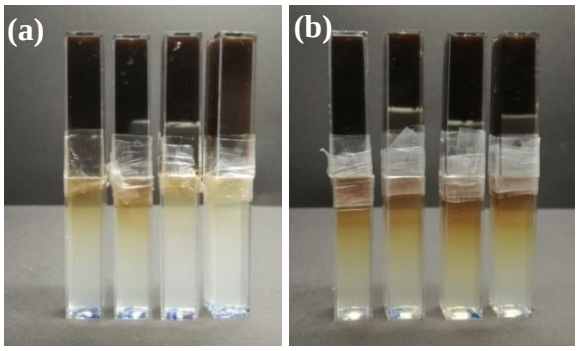
Na obrázku (Obr. 94) jsou uvedeny snímky difúzních párů rozdělených rostlinnými kutikulami izolovanými enzymatickou metodou. Z předložených snímků je patrné, že lignohumát draselný nepenetruje skrze adaxiální kutikuly tak rychle jako v případě abaxiálních kutikul, jejichž struktura je tvořena stomaty. V případě abaxiálních kutikul došlo k penetraci LH již po 1 dni působení

(Obr. 94b), naopak v případě adaxiálních kutikul (Obr. 94a) byla penetrace lignohumátu draselného zaznamenána až po 3 dnech difúze.



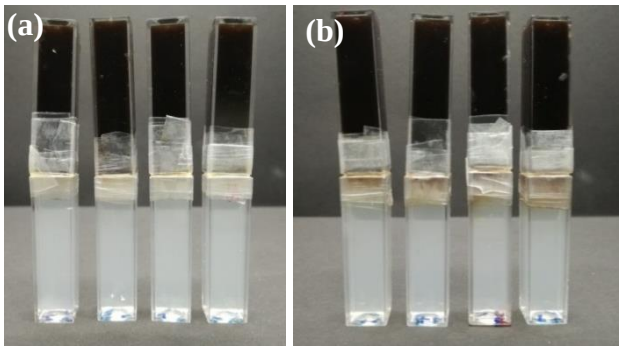
Obr. 94 Snímky difúzních experimentů přes enzymaticky izolované kutikuly po 1 dni působení 1 hm. % LH při teplotě 25 °C. Adaxiální kutikuly (a), abaxiální kutikuly (b).

Na následujících obrázcích (Obr. 95) je zaznamenán transport LH přes enzymaticky izolované kutikuly po 7 dnech od přípravy, kde je ještě více zjevně, že abaxiální kutikula propouští snáze a rychleji LH než adaxiální kutikuly. Rozdíly v penetraci jsou dány stomaty přítomnými na spodních kutikulách, které tak usnadňují průnik do přijímacího hydrogelu.



Obr. 95 Snímky difúzních experimentů přes enzymaticky izolované kutikuly po 7 dnech působení 1 hm. % LH při teplotě 25 °C. Adaxiální kutikuly (a), abaxiální kutikuly (b).

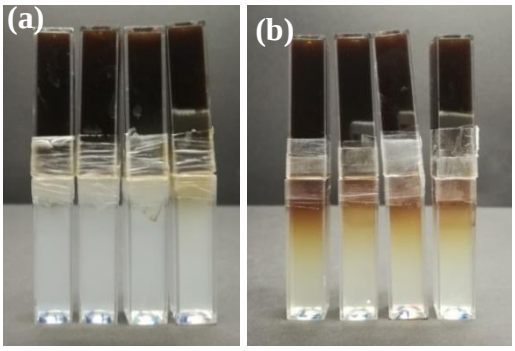
Obdobných výsledků bylo dosaženo i pro chemicky izolované kutikuly (Obr. 96). Abaxiální kutikuly usnadňovaly průnik LH do přijímacího hydrogelu v porovnání s adaxiálními kutikulami. I u těchto experimentů platilo, že průnik LH přes adaxiální kutikuly byl detekovatelný na UV-VIS spektrometru po 3 dnech působení přípravku, a naopak abaxiální kutikuly propouštěly lignohumát draselný hned po prvním dnu měření.



Obr. 96 Snímky difúzních experimentů přes chemicky izolované kutikuly po 1 dnech působení 1 hm. % LH při teplotě 25 °C. Adaxiální kutikuly (a), abaxiální kutikuly (b).

Stejně jako tomu bylo v případě enzymaticky izolovaných kutikul, i zde bylo provedeno měření v závislosti na čase. Na Obr. 97 jsou uvedeny snímky difúzních párů rozdělených kutikulami po

7 dnech působení LH, kde opět zřejmý posun LH v přijímací kyvetě. Z vizuálního porovnání se zdá, že enzymaticky izolované kutikuly propouštějí LH lépe než chemicky izolované kutikuly. Obzvláště je to patrné ze snímků po 7 dnech působení LH.



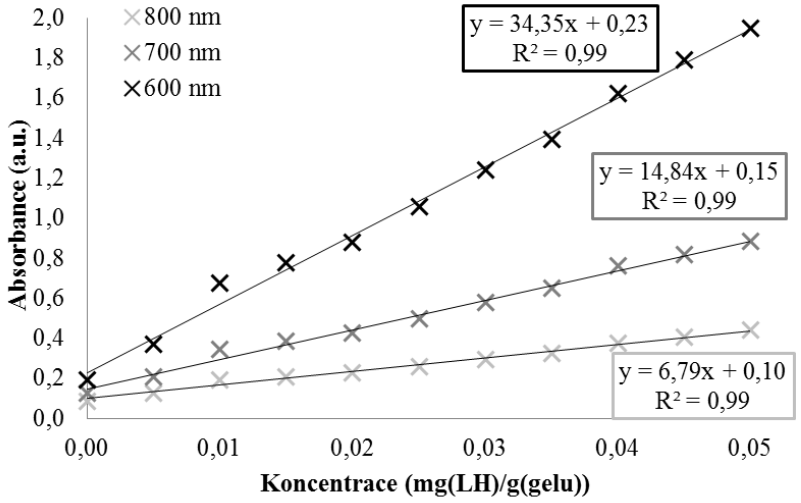
Obr. 97 Snímky difúzních experimentů pro chemicky izolované kutikuly po 7 dnech působení 1 hm. % LH při teplotě 25 °C. Adaxiální kutikuly (a), abaxiální kutikuly (b).

Stejným způsobem byly experimenty realizovány i pro teplotu 35 a 45 °C. Opět bylo docíleno stejných výsledků jako u experimentů probíhajících při 25 °C, tedy že lignohumát draselný rychleji penetruje přes abaxiální kutikuly než adaxiální kutikuly. Zároveň platilo, že čím vyšší teplota, tím rychleji vizuálně penetrace LH skrz kutikuly probíhala.

7.3.2 Vyhodnocení difúzních experimentů pro teplotu 25 °C

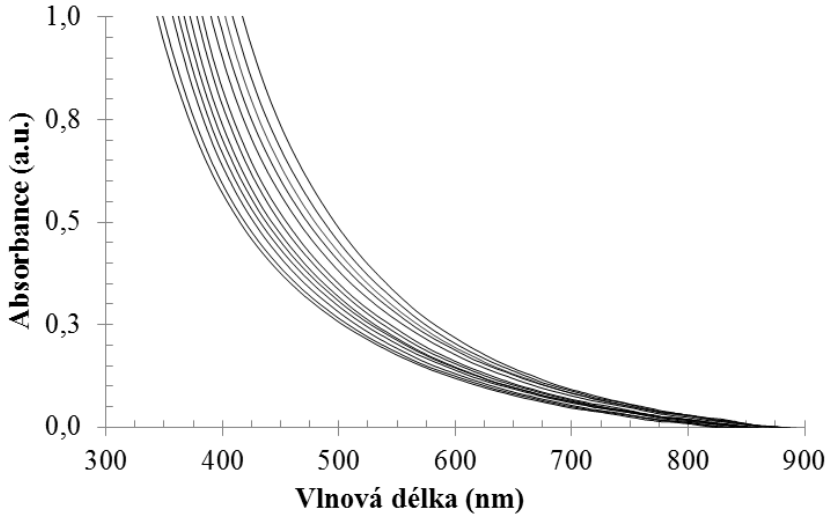
Přijímací hydrogely byly v časových intervalech proměřeny na UV-VIS spektrometru, k čemuž bylo využito speciálního posuvného nástavce, který umožňuje vertikální posun kyvety, a tak změření spekter v různých pozicích kyvety. Spektra jsou tvořena kombinací dvou příspěvků, turbidita hydrogelu způsobující rozptyl světla na pevných částicích agarózy a absorpce světla na rozpuštěném lignohumátu nacházejícího se v kapalné 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. 98.



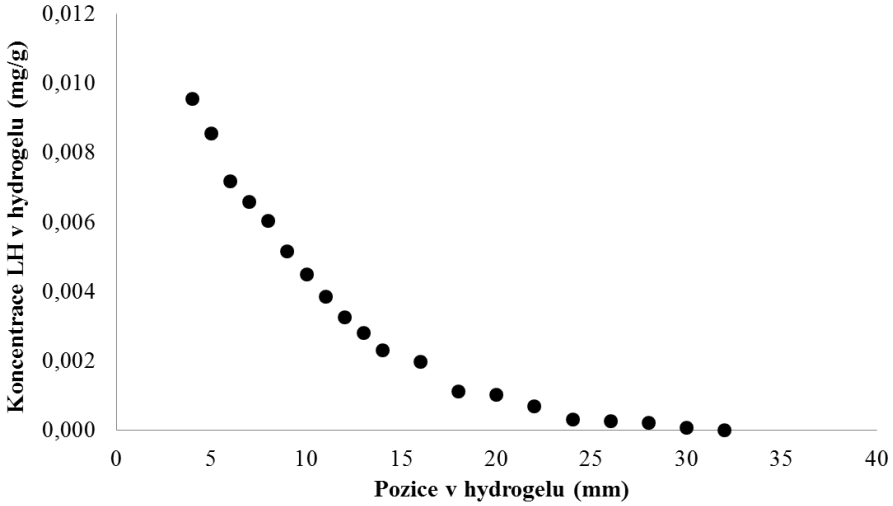
Obr. 98 Kalibrační křivka pro agarózové hydrogely a homogenně rozptýlený lignohumát draselný. Koncentrace LH v jednotlivých vzorcích kalibrační křivky (0; 0,005; 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030; 0,035; 0,040; 0,045; 0,050 hm. %).

Naměřená UV-VIS spektra LH nemají tvar klasického píku, ale jsou charakteristické absorpčním spektrem nacházejícího se v širokém rozmezí vlnových délek (Obr. 99), což je typická spektroskopická vlastnost pro huminové látky.



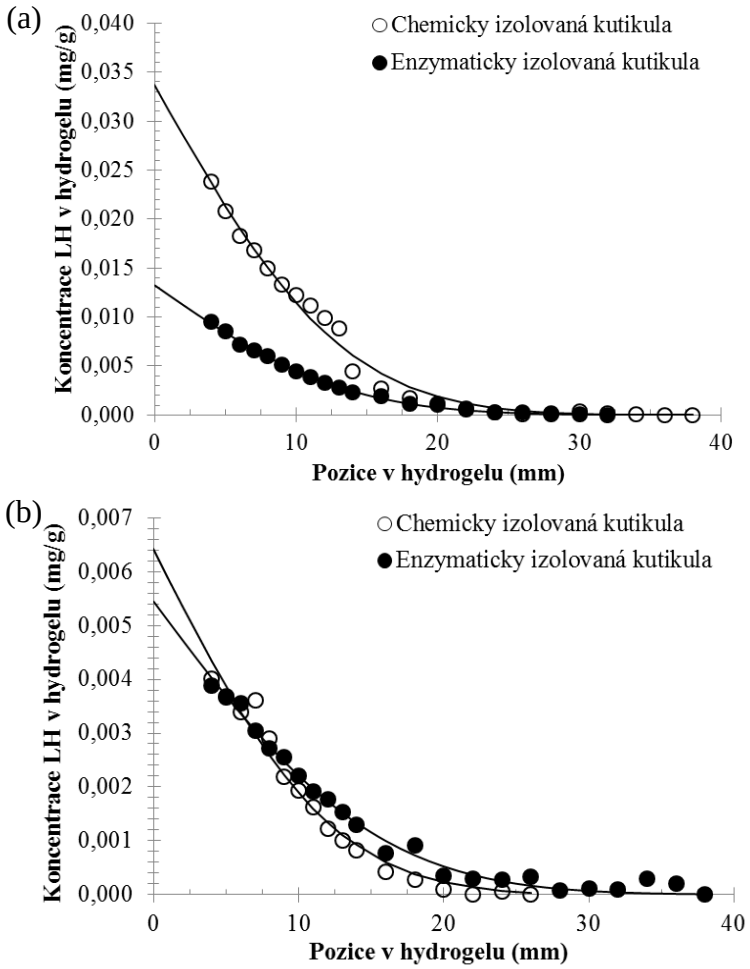
Obr. 99 Příklad UV-VIS spekter naměřených pro různé pozice přijímacího hydrogelu. Vzorek adaxiální chemicky izolované kutikuly po 96 hodinách.

Z naměřených UV-VIS spekter bylo možné sestavit tzv. koncentrační profily (Obr. 100), 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 kyvety (kutikula/hydrogel), kde tato koncentrace LH nebyla dále detekovatelná pomocí UV-VIS spektrometrie, kvůli vysoké absorbanci v prvních 5 mm kyvety.



Obr. 100 Koncentrační profil pro abaxiální enzymaticky izolovanou kutikulu. Doba penetrace LH 96 hodin.

Pro stanovení efektivního difúzního koeficientu a koncentrace na rozhraní kyveta/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. 101a, b), k čemuž byla využita funkce Řešitel z programu Microsoft Excel.



Obr. 101 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 (46):

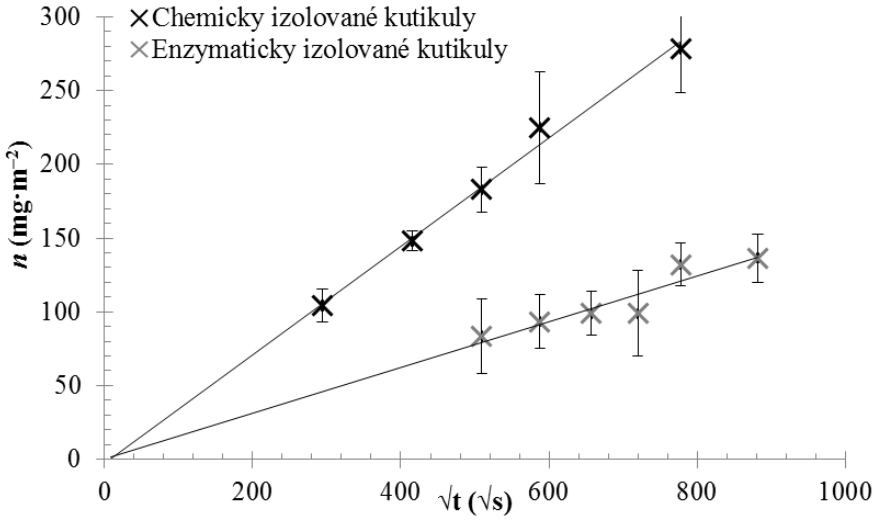
$$c = \mathrm{A} \cdot \mathrm{erfc}\sqrt{\frac{x}{\mathrm{B}}}\,, \tag{46}$$

kde c je koncentrace lignohumátu draselného v mg_{LH}/g_{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 [130]. Při známých parametrech A a B v daném čase t lze celkový difúzní tok Lignohumátu A v jednotkové oblasti n (v mg_{LH}/m^2) snadno určit z integrace rovnice (46) v rozmezí $x = 0$ až $x = \infty$. Výsledkem je rovnice (47):

$$n(t) = \rho_{\mathrm{gel}} \cdot \frac{\mathrm{A}\cdot\mathrm{B}}{\sqrt{\pi}} \tag{47}$$

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

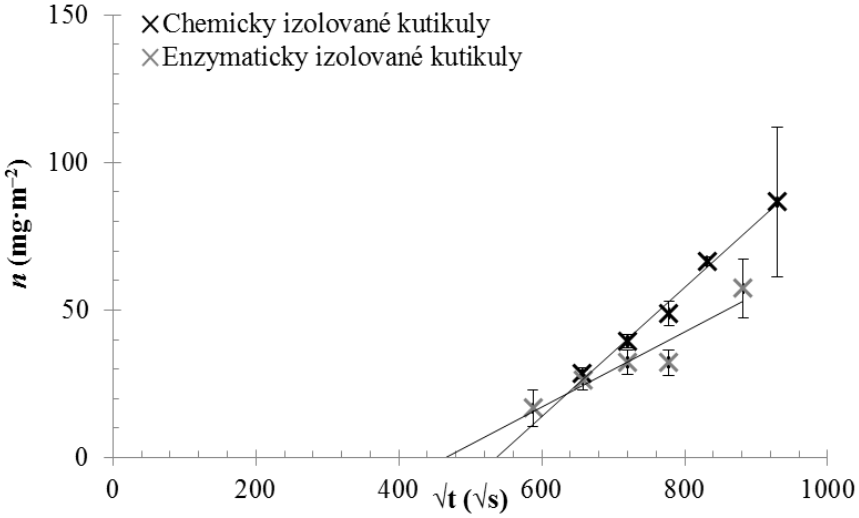
Pro nestacionární Fickovu difúzi rozpuštěné látky v kompozitním médiu se celkový difuzní tok n lineárně zvyšuje s druhou odmocninou času. Lineární závislost byla pozorována pro difúze Lignohumátu A skrze všechny studované rostlinné kutikuly (Obr. 10203 a Obr. 103).



Obr. 102 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. 102) 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. 103), 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.

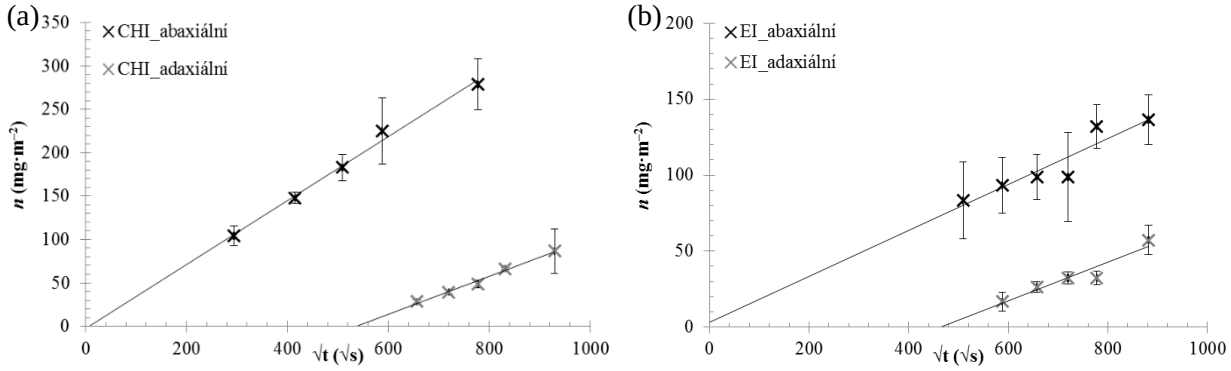


Obr. 103 Závislost totálního difúzního toku LH na odmocnině z času. Křivky zobrazené pro adaxiální kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou.

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 strukturními

rozdíly kutikul izolovaných odlišnými metodami. Například metodou mechanické profilometrie (kap. 7.1.4) bylo zjištěno, že chemicky izolované kutikuly jsou tenčí než kutikuly izolované enzymatickou metodou. Tyto výsledky korespondovaly se snímky pořízenými na rastrovacím elektronovém mikroskopu (kap. 7.1.3). Z výše uvedených fotografií je patrná strukturní odlišnost kutikul, dále jsou zde zachyceny neodstraněné zbytky mezofylu, který tloušťku kutikul ovlivňuje.

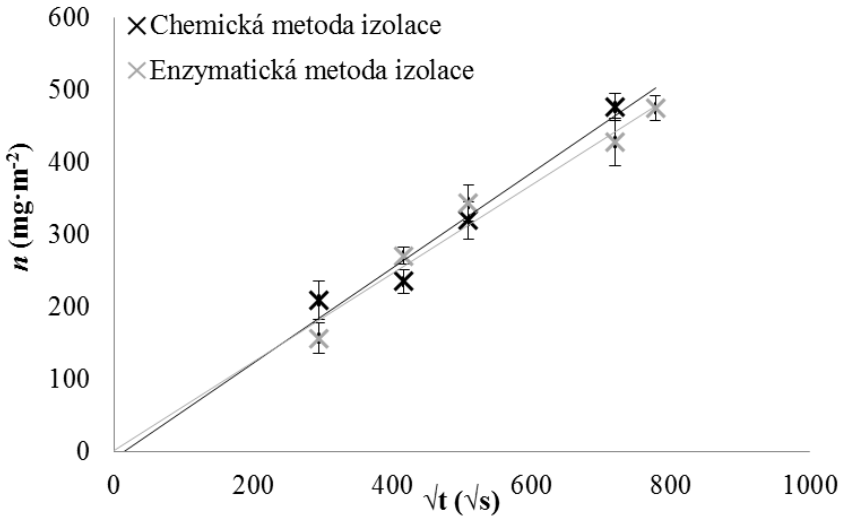
Zobrazení rozdílů totálních difúzních toků pro adaxiální a abaxiální kutikuly izolované chemicky a enzymaticky jsou uvedeny na Obr. 104. Z grafů je zřejmé, že v obou případech došlo k rychlejší penetraci LH skrze abaxiální kutikuly, a naopak pomalejší byl transport lignohumátu draselného skrz adaxiální 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. 104 Porovnání křivek totálních toků pro adaxiální a abaxiální kutikuly izolované chemickou metodou (a) a enzymatickou metodu (b).

7.3.3 Vyhodnocení difúzních experimentů pro teplotu 35 °C

Simulace foliárního hnojení za laboratorních podmínek byly realizovány i při teplotě 35 °C. Touto teplotou byly simulovány horké letní dny, avšak vzorky byly uloženy do exikátoru s vodou, aby bylo docíleno 100% vlhkosti a nedocházelo k rychlému vysychání hydrogelů, což by výrazně zkreslilo výsledky měření.



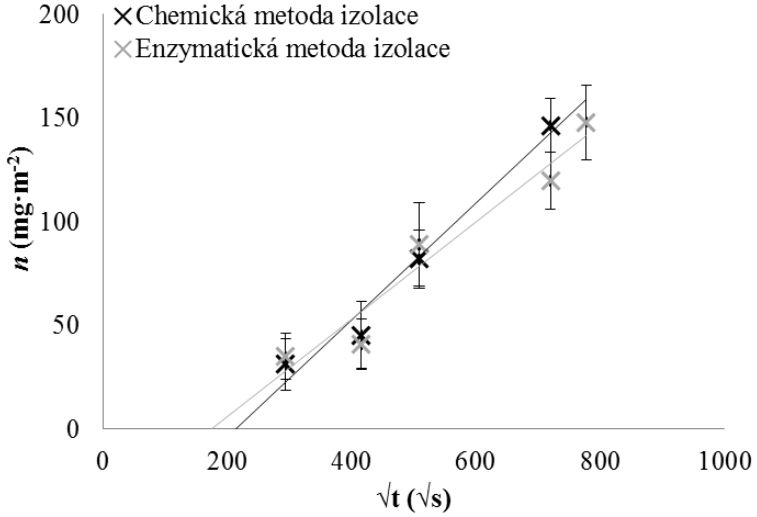
Obr. 105 Závislost difúzních toků LH na odmocnině z času. Křivky zobrazené pro abaxiální kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou.

Z naměřených UV-VIS spekter byly obdobným způsobem sestaveny koncentrační profily jednotlivých experimentů, které byly proloženy teoretickou křivkou, bylo opět využito metody nejmenších čtverců a k proložení dat byl využit nástroj citlivostní analýzy Řešitel (MS Excel).

Výsledkem všech výpočtů, které jsou zmíněny výše v kapitole 7.3.3, byl graf závislosti totálního difúzního toku na odmocnině z času (Obr. 105) pro penetraci LH skrz abaxiální rostlinné kutikuly.

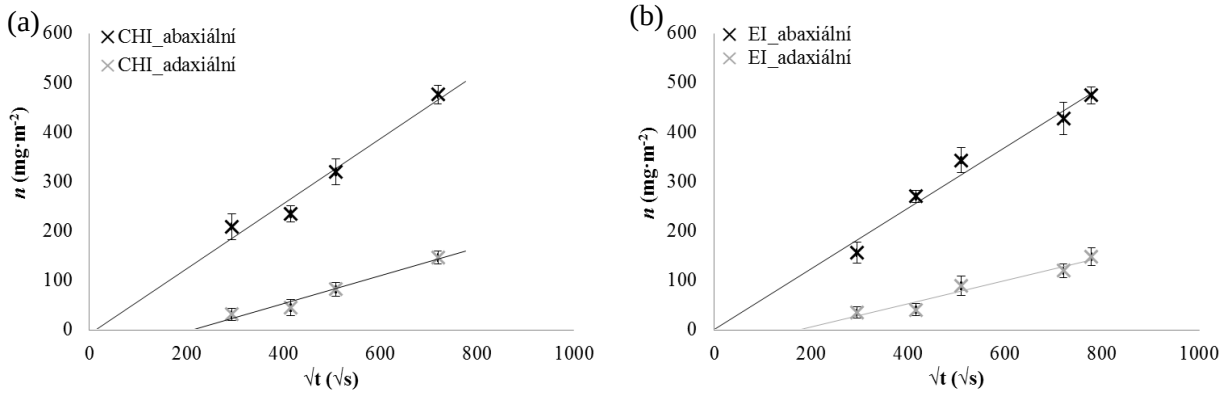
Z grafu (Obr. 105) jsou patrné lineárně rostoucí křivky pro oba typy rostlinných kutikul. Chemicky izolované kutikuly dosahují mírně vyšších hodnot totálních toků než difúze probíhající skrz enzymaticky izolované kutikuly, avšak v rámci nejistoty měření se jedná o dva difúzní procesy, které probíhají v měřených časech stejnou mírou. Toto zjištění bylo velmi zajímavé, neboť bylo předpokládáno, že rozdíl v tloušťce a struktuře rostlinných kutikul bude natolik převládající, že neovlivní difúzní procesy LH. Avšak z výsledků je zřejmé, že se změnou teploty klesá vliv struktury kutikul na penetraci LH.

Podobných výsledků bylo dosaženo i v případě adaxiálních kutikul. Z naměřených UV-VIS spekter byla sestavena závislost totálního difúzního toku na odmocnině z času (Obr. 106). Chemicky izolované rostlinné kutikuly mírně převládají svými hodnotami nad enzymaticky izolovanými, avšak opět v rámci chyby měření bylo dosaženo stejných procesů pro oba typy kutikul. I v tomto případě strukturní rozdíly kutikul nehrály významnou roli v penetraci LH.



Obr. 106 Závislost difúzních toků LH na odmocnině z času. Křivky zobrazené pro adaxiální kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou.

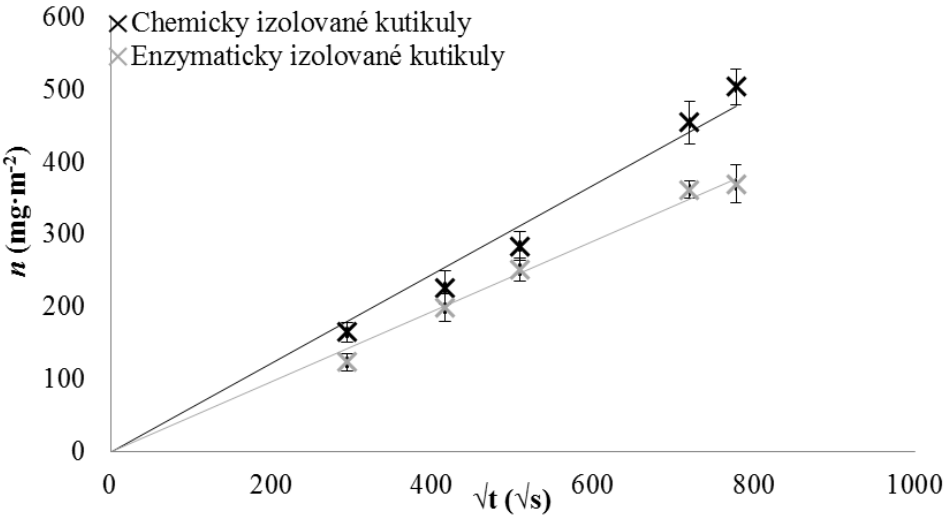
Souhrn výsledků z realizovaných experimentů je uveden v grafech (Obr. 107), z nichž je zřejmý rozdíl v penetracích LH skrze abaxiální a adaxiální kutikuly. Pro chemicky izolované kutikuly platí, že totální difúzní tok pro abaxiální kutikuly je 3,2krát větší než pro adaxiální kutikuly. Podobných výsledků bylo dosaženo i v případě enzymaticky izolovaných kutikul, kde totální difúzní tok pro abaxiální kutikuly byl rovněž vyšší 3,2krát.



Obr. 107 Porovnání křivek totálních toků pro adaxiální a abaxiální kutikuly izolované chemickou metodou (a) a enzymatickou metodu (b).

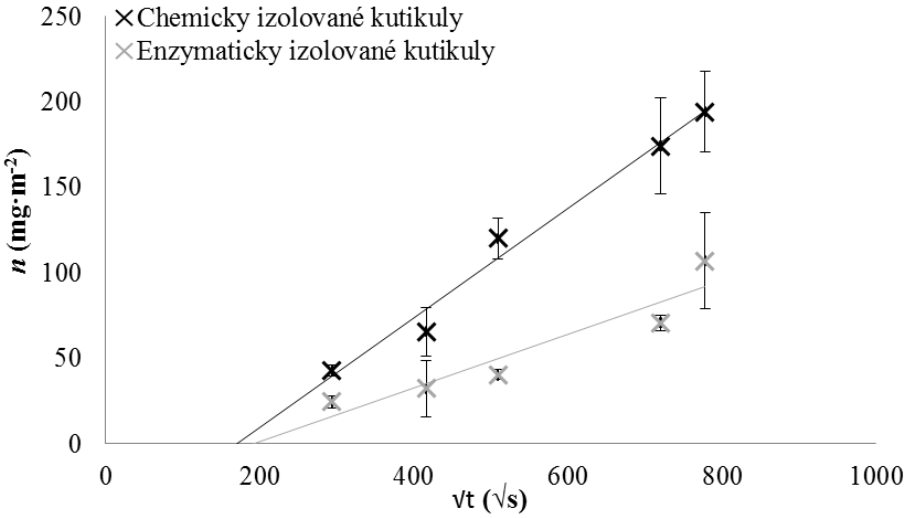
7.3.4 Vyhodnocení difúzních experimentů pro teplotu 45 °C

Simulace foliárního hnojení byla také realizována pro teplotu 45 °C, která měla simulovat velmi horké letní podmínky. Z naměřených UV-VIS spekter a matematických výpočtů byl sestaven graf (Obr. 108) závislosti totálního difúzního toku na odmocnině z času. Z uvedeného grafu je opět zřejmý rozdíl mezi kutikulami izolovanými enzymatickou a chemickou metodou, opět lépe penetrovatelnou membránou pro LH se stala abaxiální kutikula izolovaná chemicky ve srovnání s kutikulami izolovanými enzymaticky. Tento výsledek je opět podmíněn tloušťkou abaxiálních chemicky izolovaných kutikul, která dosahuje hodnoty 4±1 μm, naopak abaxiální kutikuly izolované enzymaticky dosahují tloušťky 7±2 μm.



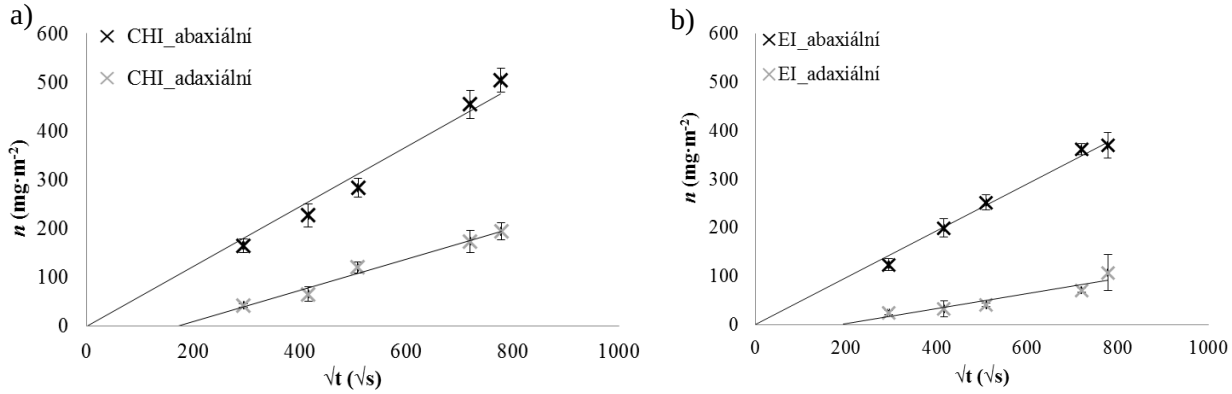
Obr. 108 Závislost totálních difúzních toků LH na odmocnině z času. Křivky zobrazené pro abaxiální kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou.

V grafu (Obr. 109) jsou znázorněny výsledky totálních difúzních toků pro adaxiální kutikuly izolované chemicky a enzymaticky. Z výsledků je zřejmý rozdíl v penetraci LH skrze studované kutikuly, stejně jako v případě abaxiálních kutikul, LH lépe penetroval skrze chemicky izolované kutikuly. To bylo opět způsobeno odlišnostmi v tloušťkách rostlinných kutikul a chemicky izolované adaxiální kutikuly byly tenčí, dosahovaly hodnoty 5±1 μm, naopak enzymaticky izolované kutikuly dosahovaly hodnoty 9±1 μm.



Obr. 109 Závislost difúzních toků LH na odmocnině z času. Křivky zobrazené pro adaxiální kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou.

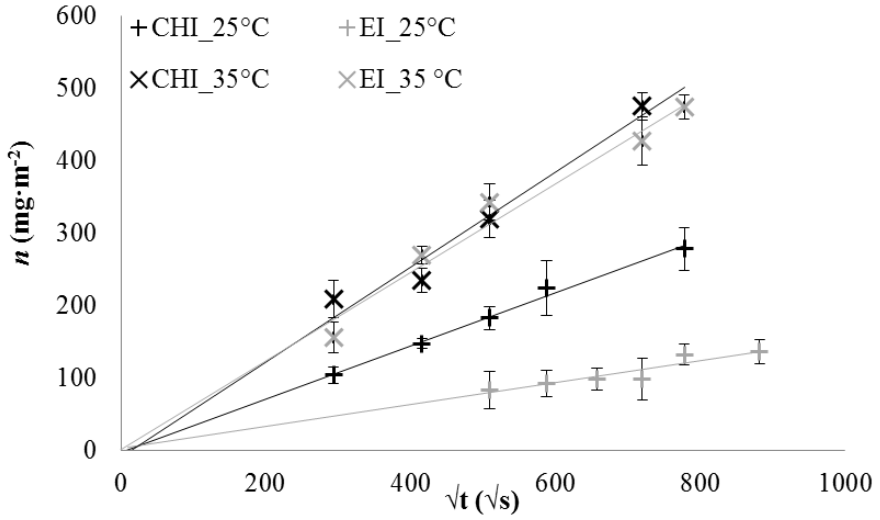
Souhrn výsledků pro chemicky a enzymaticky izolované kutikuly je uveden v grafech (Obr. 110). Z vynesených křivek je patrný časový posun mezi penetrací LH probíhající skrz abxiální kutikuly a adaxiální kutikuly pro oba studované typy materiálů. Pro vzorky abaxiálních kutikul je pozorovatelný okamžitý průnik LH v obou případech metod izolace. Pro vzorky chemicky izolovaných adaxiálních kutikul dochází k průniku lignohumátu draselného po 13 hodinách a pro enzymaticky izolované kutikuly po 14 hodinách. V případě enzymaticky izolovaných adaxiálních kutikul dochází ke zpoždění penetrace LH oproti chemicky izolovaným kutikulám o 1 hodinu.



Obr. 110 Porovnání křivek totálních toků pro adaxiální a abaxiální kutikuly izolované chemickou metodou (a) a enzymatickou metodu (b).

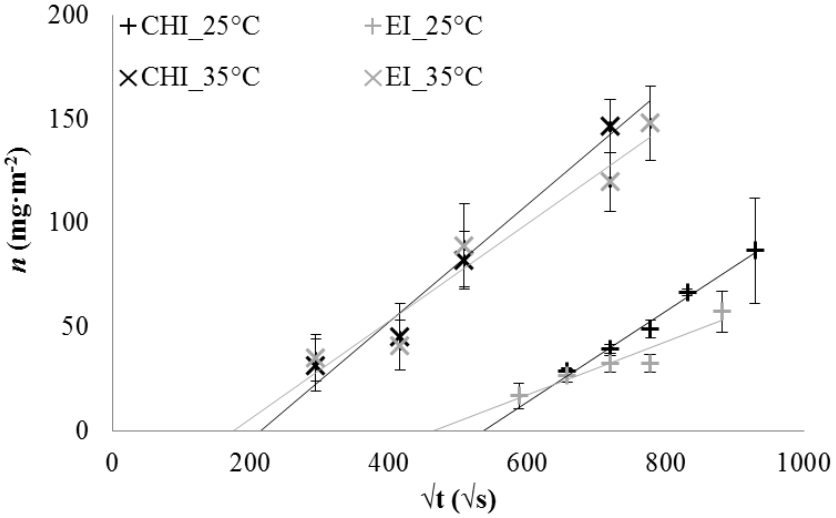
7.3.5 Porovnání a souhrn výsledků difúzní experimentů přes rostlinné kutikuly pro teploty 25, 35 a 45 °C

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. 111). 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.



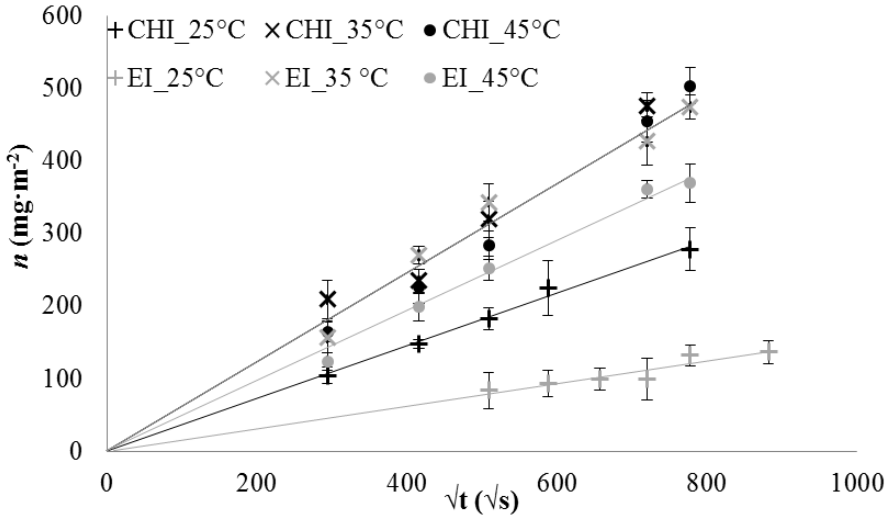
Obr. 111 Porovnání difúzních experimentů LH skrze abaxiální rostlinné kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou pro teploty 25 a 35 °C.

V grafu (Obr. 112) 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.



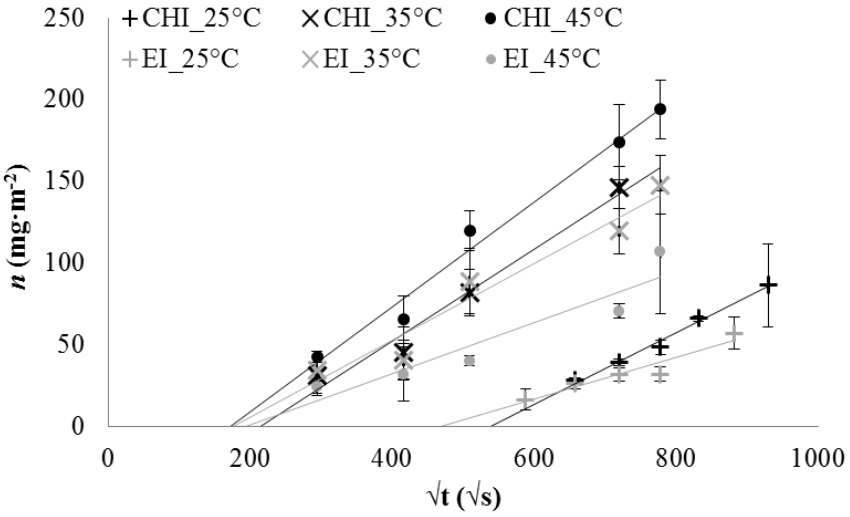
Obr. 112 Porovnání difúzních experimentů LH skrze adaxiální rostlinné kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou pro teploty 25 a 35 °C.

V uvedeném grafu (Obr. 113) 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. 113 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.

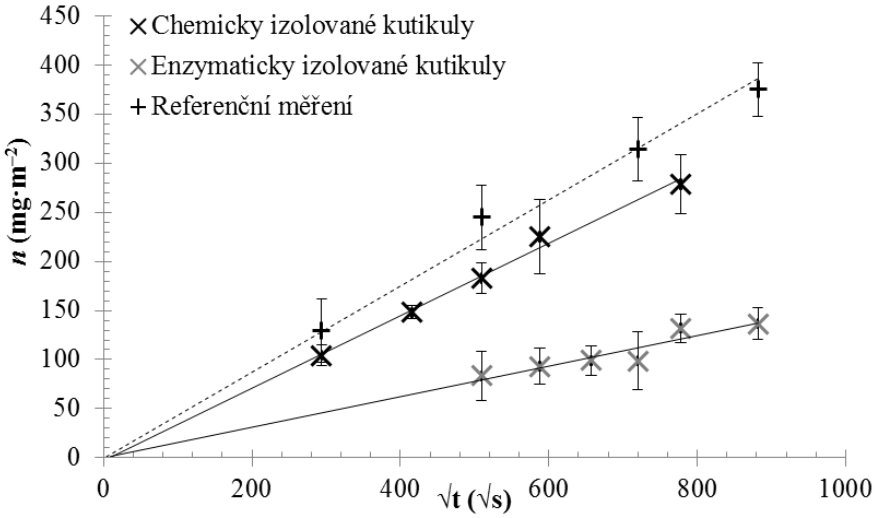
Výsledky adaxiálních kutikul izolovaných chemickou a enzymatickou metodou jsou uvedeny v grafu (Obr. 114). V případě experimentů realizovaných za podmínek 45 °C bylo docíleno navýšení totálního difúzního toku pro chemicky izolované kutikuly, ovšem enzymaticky izolované kutikuly dosahovaly nižších hodnot 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. 114 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.

7.3.6 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. 115).



Obr. 115 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.

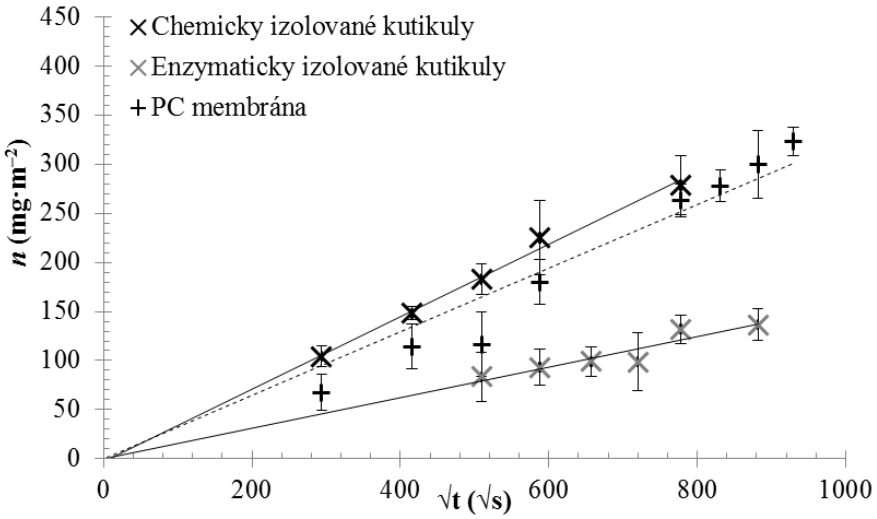
Z grafu je patrné, že difúze lignohumátu draselného v referenčních a reálných vzorcích probíhá stejně, tedy jedná se o lineárně rostoucí průběh. Avšak v referenčních vzorcích LH difunduje rychleji, což je logicky dané tím, že tyto vzorky neobsahují membránu, která by difúzi LH zpomalovala.

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.

7.3.7 Difúzní experimenty realizované přes syntetické membrány s póry o velikosti 10 µm při teplotě 25 °C pro model nestacionární difúze (difúzní pár)

Difúzní experimenty založené na polykarbonátových (PC) membránách o velikosti pórů 10 µm byly realizované za účelem vytvoření přesnějších referenčních měření, se kterými by bylo možné reálné experimenty porovnat. Membrány s póry 10 µm byly zvoleny z důvodů velikostí stomat, které byly stanoveny na reálných vzorcích optickou mikroskopií (kap. 7.1.5).

Ze získaných UV-VIS spekter byla vypočtena opět závislost celkového difúzního toku na odmocnině z času a tyto výsledky byly porovnány s výsledky reálných experimentů. Z grafu (Obr. 116) je patrné, že referenční vzorek se chová stejně jako reálné vzorky abaxiálních kutikul izolovaných chemickou metodou. To mohlo být způsobeno tím, že membrána má stejnou tloušťku jako chemicky izolované kutikuly.



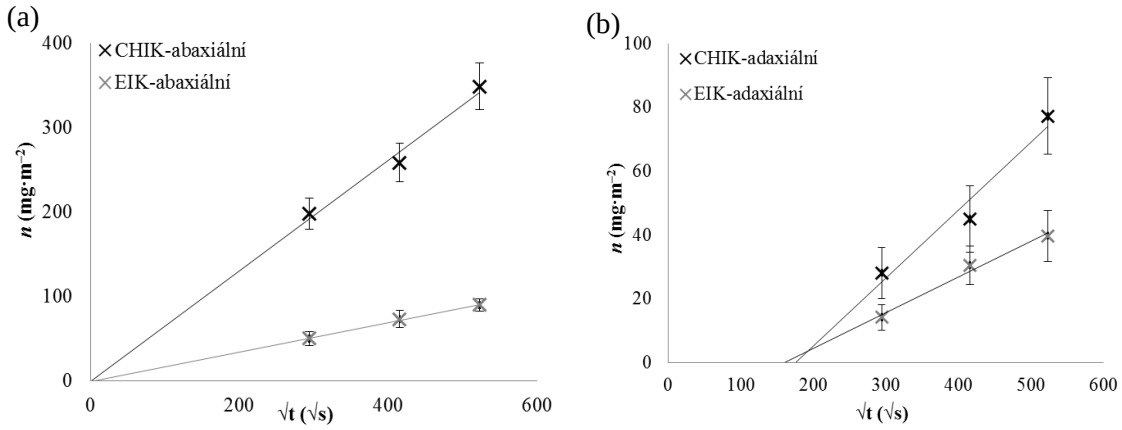
Obr. 116 Porovnání výsledků transportu LH přes rostlinné kutikuly a přes PC membrány s póry o velikosti 10 µm. Experimenty probíhaly při teplotě 25 °C.

7.3.8 Vyhodnocení experimentů difúze z roztoku při teplotě 25 °C

Model difúze z roztoku byl realizován za účelem další možnosti studia penetrace LH přes rostlinné kutikuly. Tato metoda je založená na ponoření přijímacích kyvet do 1 hm. % roztoku lignohumátu draselného a v časových intervalech (3 dny) bylo provedeno měření na UV-VIS spektrometru a z UV-VIS spekter byl sestaven graf závislosti celkového difúzního toku na odmocnině z času (Obr. 117).

Z výsledků je patrné, že lignohumát draselný rychleji penetruje abaxiálními i adaxiálními chemicky izolovanými kutikulami než kutikulami izolovanými enzymatickou metodou. Pomalejší transport LH enzymatickými kutikulami je zapříčiněný větší tloušťkou kutikul, kde LH musí překonávat tak silnější membránu než v případě chemicky izolovaných kutikul, u nichž dochází při izolaci k odstranění větší vrstvy mezofylu.

Z uvedených grafů je dále patrné, že v případě abaxiálních kutikul izolovaných chemickou metodou došlo k velmi rychlé penetraci LH, neboť již po 24 hodinách měření dosahoval celkový difúzní tok hodnoty 198 $mg \cdot m^{-2}$. Tato hodnota je téměř 2krát vyšší než pro experimenty realizované modelem difúzního páru, kde celkový difúzní tok LH přes adaxiální chemicky izolované kutikuly odpovídal 104,3 $mg \cdot m^{-2}$. V případě abaxiálních enzymaticky izolovaných kutikul bylo rovněž dosaženo rychlejších výsledků penetrace LH metodou difúze z roztoku, hodnota totálního difúzního toku odpovídala 50 $mg \cdot m^{-2}$ po 24 hodinách a v případě nestacionární difúze odpovídala 83 $mg \cdot m^{-2}$ po 72 hodinách penetrace.

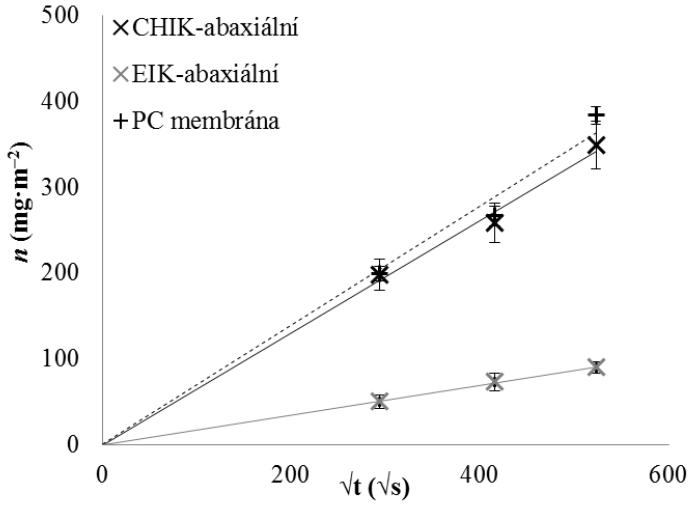


Obr. 117 Závislost difúzního toku na odmocnině z času pro abaxiální (a) a adaxiální (b) kutikuly izolované chemickou a enzymatickou metodou. Difúzní experiment pro model difúze z roztoku.

Podobných výsledků bylo dosaženo i v případě adaxiálních kutikul. Lignohumát draselný dosahoval po 24 hodinách penetrace skrz chemicky izolované kutikuly hodnoty celkového difúzního toku 28,3 $mg \cdot m^{-2}$, což bylo v případě nestacionární difúze dosaženo až po 96 hodinách. V případě penetrace LH skrz enzymaticky izolované kutikuly bylo dosaženo hodnoty celkového difúzního toku 14 $mg \cdot m^{-2}$ po 24 hodinách modelem difúze z roztoku, a naopak v modelu difúzního páru bylo dosaženo této hodnoty rovněž po 96 hodinách.

7.3.9 Difúzní experimenty realizované přes syntetické membrány s póry o velikosti 10 µm při teplotě 25 °C pro model difúze z roztoku

Rovněž i pro model nestacionární difúze z roztoku byly vytvořeny referenční experimenty přes PC membrány o velikosti pórů 10 µm. Experimenty byly založeny na přijímacích hydrogelech, na které byly upevněny PC membrány a ty byly ponořeny do 1 hm. % roztoku LH. Následující 3 dny byly tyto kyvety proměřovány na UV-VIS spektrometru. Z naměřených dat byly sestaveny grafy závislosti celkového difúzního toku na odmocnině z času a tyto hodnoty byly porovnány s reálnými experimenty (Obr. 118).



Obr. 118 Porovnání výsledků transportu LH přes rostlinné kutikuly a přes PC membrány s póry o velikosti 10 µm. Experimenty probíhaly při teplotě 25 °C.

Z uvedené závislosti je patrné, že referenční experimenty dosahovaly obdobných výsledků jako reálné experimenty pro abaxiální chemicky izolované kutikuly. Porovnáním výsledků pro difúzi z roztoku a difúzní pár bylo zjištěno, že v obou případech je průběh experimentů velmi podobný, a tudíž je možné oba tyto modely brát jako vhodné pro stanovení míry penetrace LH skrze rostlinné

kutikuly. Zároveň je možné tyto modely vzájemně porovnávat, neboť z dosažených výsledků je zřejmé, že difúze LH má stejný průběh.

8 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 dizertační 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. 14 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 intertnost 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. 105 (respektive Obr. 109 a Obr. 111) 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 tlouštěk kvůli nerozpuštěné vrstvě polysacharidů, což je v korelaci s naměřenými daty.

Difúzní experimenty byly realizovány při různých teplotách (25, 35 a 45 °C), které měly simulovat různé podmínky růstu rostlin a potenciální foliární aplikace lignohumátu. Na základě sumarizace výsledků Obr. 119 je patrné, že transport látek v závislosti na teplotě probíhal podobným trendem, ale větší mírou v případě srovnání výsledků pro 25 a 35 °C, ale tento trend se nepotvrdil pro případ 45 °C. To je vysvětleno tím, že difúzní experimenty nebyly dostatečně utěsněny a vysoká teplota zapříčinila po pár dnech vysušení styčných ploch přijímacího a zdrojového hydrogelu, což vedlo k znemožnění transportu, a tedy ovlivnění výsledků difúzních experimentů.

Z difúzních experimentů je rovněž patrné, že adaxiální kutikuly propouštějí aktivní látku v podobě lignohumátu výrazně pomaleji v porovnání s abaxiálními. Z pravidla platí, že LH prodifunduje skrz adaxiální kutikulu po 3 dnech. Tento jev byl charakterizován isotermální mikrokalorimetrií, kde bylo stanoveno, že rychlostní konstanta procesu je u adaxiálních kutikul přibližně 0,5krát nižší než v případě abaxiálních kutikul.

Poslední srovnání bylo provedeno pro systém nestacionární difúze z roztoku. Z dosažených výsledků (Obr. 118) bylo opět potvrzeno, že abaxiální kutikuly a chemicky izolované kutikuly umožňují rychlejší transport látek.

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.

9 VÝSLEDKY A DISKUZE – EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST II

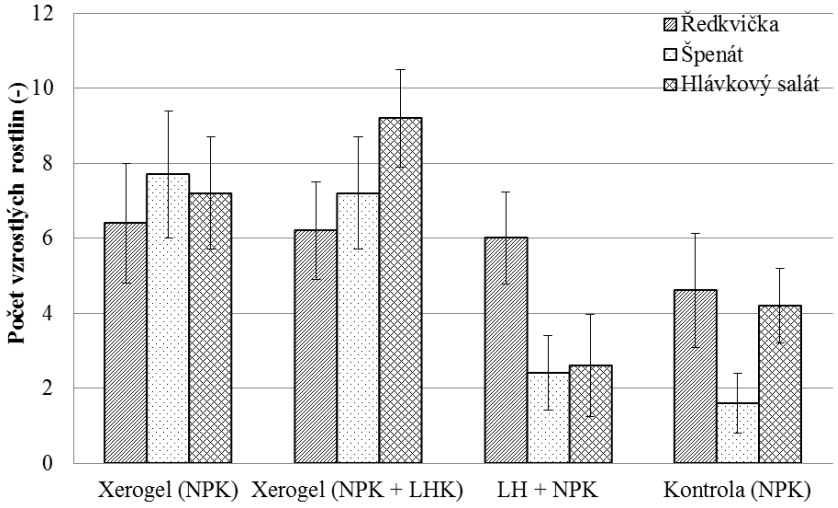
9.1 Vliv aplikovaných přípravků na vzrůst a kondici rostlin

Tato kapitola je věnována celkovému zhodnocení skleníkových experimentů, zejména je zaměřena na základní charakterizace rostlin a vzorků půdy. V této části jsou rovněž diskutovány dosažené výsledky.

9.1.1 Počet vzrostlých rostlin

Po zasetí semen plodin a jejich průběžného zalévání dosáhly rostliny po 14 dnech dostatečného vzrůstu, aby mohlo dojít k procesu protrhávání, kdy výsledkem je jediný jedinec, který je ponechán k plnému vzrůstu (kap. 6.3.4). Avšak před samotným protrháváním došlo nejdříve ke spočítání všech vzrostlých plodin, díky čemuž je možné usoudit na pozitivní nebo naopak negativní vliv přípravku na vyklíčení plodin.

Do grafu (Obr. 119) byly vyneseny výsledky počtů vyklíčených rostlin pro každý použitý přípravek. Z grafu je patrné, že hydrogelové materiály mají velmi pozitivní vliv na klíčivost a vzrůst rostlin, neboť došlo k vyklíčení minimálně 60 % semen pro všechny použité druhy rostlin a aplikované přípravky. Naopak LH s NPK v použitých koncentracích nemělo významný vliv na klíčivost semen, neboť při porovnání vzešlých rostlin s kontrolními vzorky bylo dosaženo v rámci statistické chyby podobných hodnot. Výjimku tvořila pouze ředkev setá, která při ošetření LH s NPK dosahovala maximální hodnoty vzešlých rostlin 60 %.



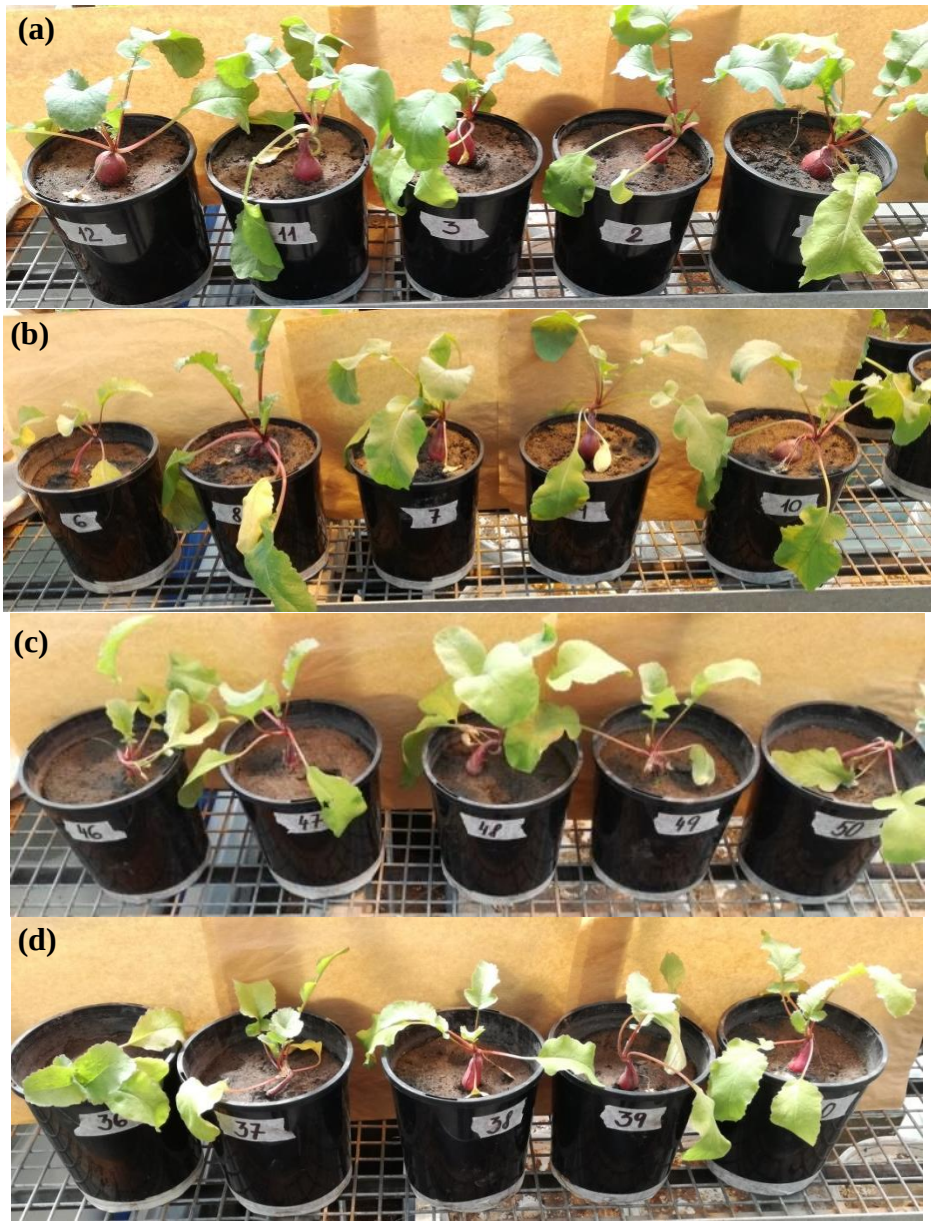
Obr. 119 Počet vzrostlých rostlin v závislosti na přípravku.

9.2 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.

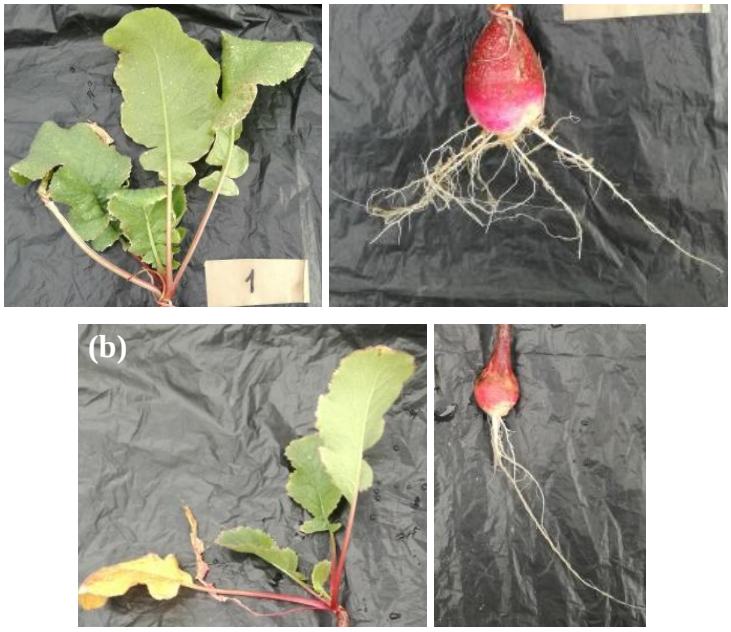
9.2.1 Ředkvička setá

Přehled ředkviček je uveden na snímcích (Obr. 120a-d), z nichž je patrné, že rostliny ošetřené hydrogelovými materiály (Obr. 120a, b) dosahují většího vzrůstu listů a stejně tak i větších plodů než rostliny ošetřené pouze LH s NPK nebo pouze NPK.



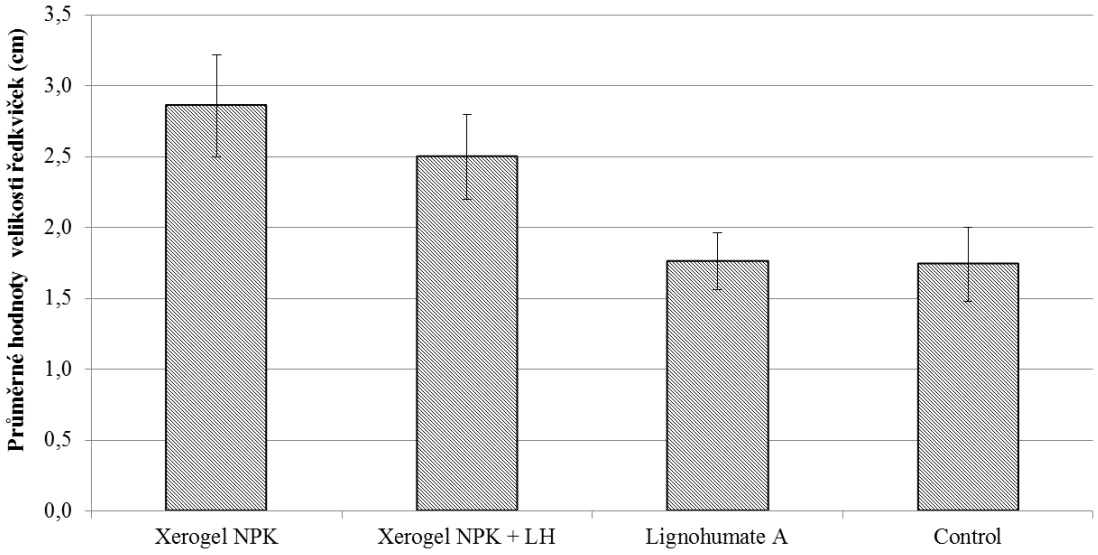
Obr. 120 Snímky z finální sklizně rostlin ředkvičky seté. Xerogel (NPK) (a), xerogel (NPK + LH) (b), LH + NPK (c) a kontrola (NPK) (d).

Následující snímky (Obr. 121) zaznamenávají rozdíly ve velikostech listů a rozvětvení kořenového systému u ředkvičky seté. Pro srovnání byly zvoleny vzorky ošetřené hydrogelem s obsahem NPK (Obr. 121a) a vzorky ošetřené LH s NPK (Obr. 121c). Ze snímků listů je patrné, že xerogel má značný vliv na velikost listů a jejich vyšší počet. Významné rozdíly jsou pozorovatelné také pro kořenový systém, ředkvička ošetřená xerogelem s obsahem NPK má rozvětvenější systém kořínků, hlavně jsou zde viditelné několik silnějších kořínků. V případě kořenového systému ředkvičky ošetřené LH s NPK je zřejmé, že má jeden hlavní kořínek, nerozvětvený a slabý.



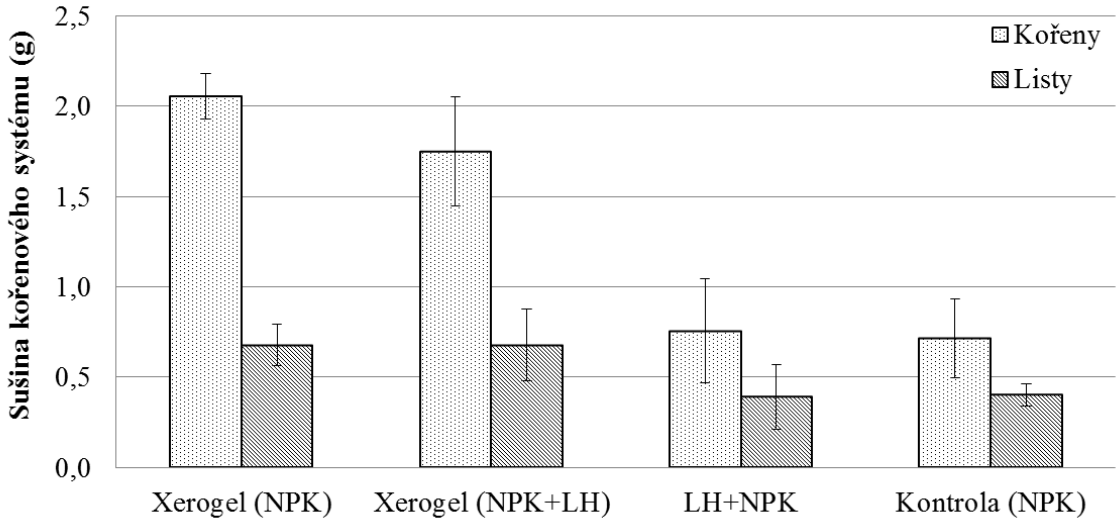
Obr. 121 Listy a kořeny ředkvičky seté po aplikaci xerogelu (NPK) (a) a LH+NPK (b) do půdy.

Plody ředkvičky seté byly rozříznuty na polovinu a byl změřen jejich průměr, naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu (Obr. 122). 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. 122 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. 123) je patrné, že rostliny ošetřené xerogelem dosahovaly vyšších hodnot hmotnosti sušiny listů než vzorky ošetřené LH s NPK nebo ošetřené pouze NPK.



Obr. 123 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.

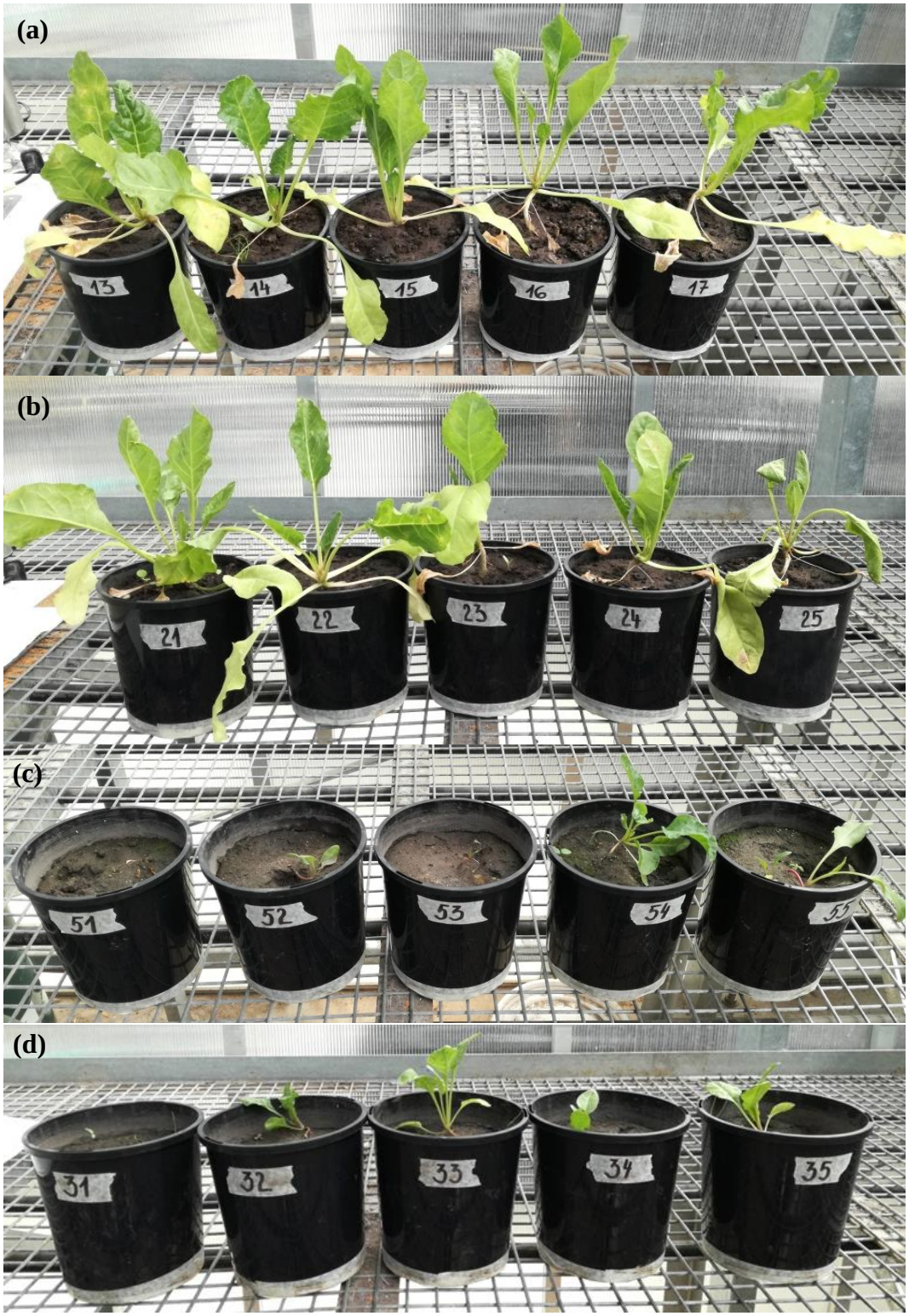
V práci [186] bylo studováno uvolňování LH z xerogelu jednoduchými luhovacími experimenty a bylo zjištěno, že xerogel (LH + NPK) uvolnil po 9 týdnech 16 mg LH na 1 l vody. Na základě těchto experimentů, které probíhaly v izolovaném prostředí při 100% vlhkosti, je patrné, že při přípravě superabsorpentů 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.

9.2.2 Špenát setý

Další studovanou rostlinou byl špenát setý, který byl před sklizní rovněž fotograficky zaznamenán (Obr. 124a-d). Ze snímků (Obr. 124a, b) je zřejmé, že listy špenátu setého ošetřeného hydrogelovými přípravky (NPK i LH+NPK) dosahovaly, jako v případě ředkvičky seté, vyššího vzrůstu než v případě ostatních aplikovaných přípravků (LH s NPK a kontrola). U vzorků, u nichž byly aplikovány xerogely, jsou pozorovatelné velké lesklé zelené listy.

V případě rostlin ošetřených lignohumátem draselným s přídavkem NPK a kontrolních vzorků (Obr. 124c, d) je zřetelné, že rostliny nedosahovaly dobré kondice, neboť byly malé, jejich stonky tenké a některé z listů byly zbarveny do tmavě zelené barvy. Dokonce v květináčích č. 51, 53 a 31 nedosahoval špenát výšky ani 4 cm, což bylo velmi podprůměrné ve srovnání s ostatními vzorky stejně ošetřených druhů květináčů.

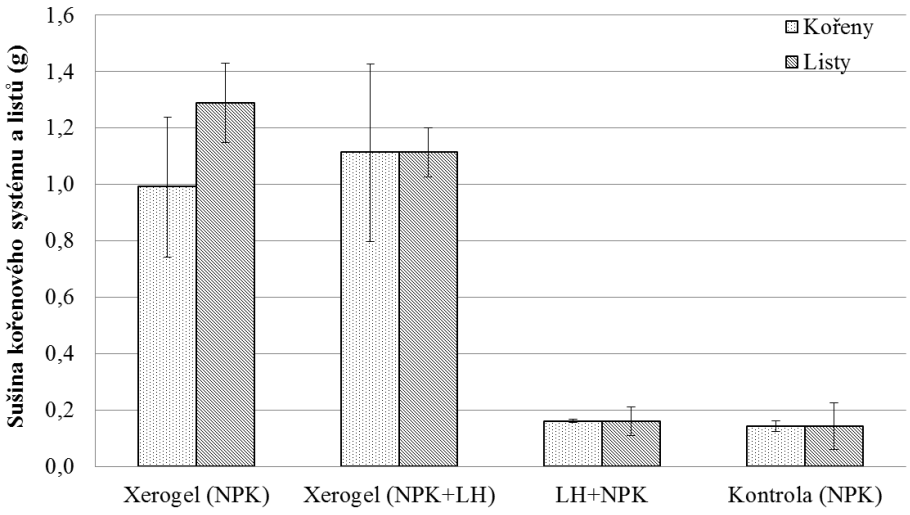


Obr. 124 Snímky z finální sklizně rostlin špenátu setého. Xerogel (NPK) (a), xerogel (NPK + LH) (b), LH + NPK (c) a kontrola (NPK) (d).

Špenát setý byl fotograficky zaznamenán, byla proměřena jeho délka a zvážení kořenového systému (Obr. 125) a listů. Ze získaných snímků (Obr. 125a) je zřejmé, že xerogelové materiály přispívají k tvorbě silného hlavního kořene, který vstupuje hluboko do půdy a z husté sítě vedlejších kořenů. Naopak kořeny ošetřené pouze LH + NPK nebo NPK neměly příliš dlouhý hlavní kořen, ten vstupoval asi 1,5 cm do půdy a z něj pak vyrůstalo několik vedlejších kořínků, které byly tenké, a krátké.

Obr. 125 Detail rozvětvení kořenového systému špenátu setého ošetřeného xerogelem (NPK) (a) a LH s NPK (b).

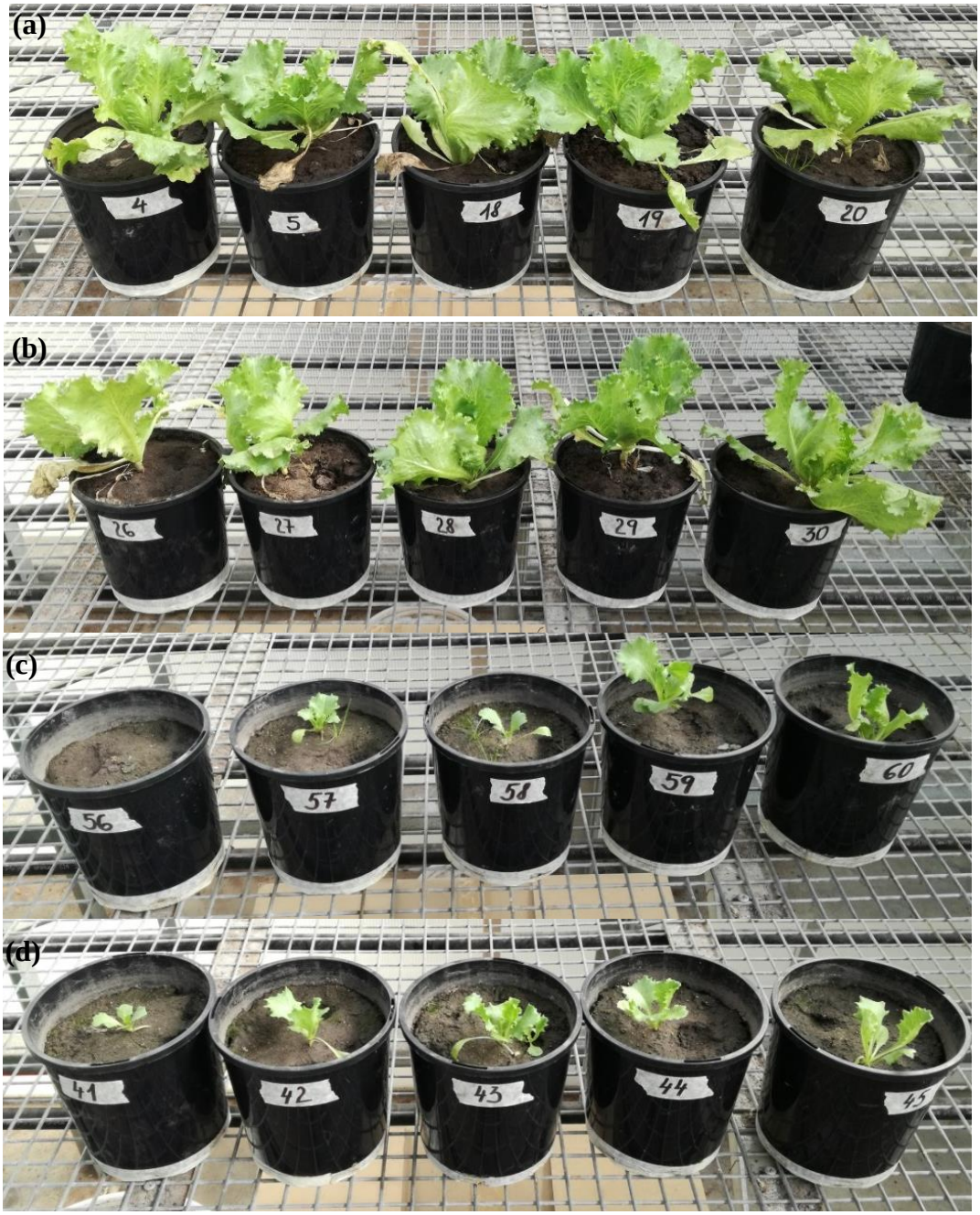
Data získaná z vážení kořenového systému a listů špenátu setého byly vyneseny do grafu (Obr. 126), ze kterého jsou jasně vidět rozdíly mezi rostlinami ošetřenými hydrogelovými materiály a ostatními přípravky. I v případě špenátu nejsou viditelné výrazné rozdíly mezi xerogelovými přípravky s obsahem LH bez jejich přídavku. 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. 126 Přehled sušiny kořenů a listů špenátu setého v závislosti na aplikovaném přípravku.

9.2.3 Hlávkový salát

Poslední studovanou rostlinou byl hlávkový salát setý (Obr. 127a-d), který se vyznačuje vysokou citlivostí na použitý materiál, a proto je velmi často používán také pro fotosenzitivní testy. Z níže uvedených fotografií je zjevné, že salát ošetřený hydrogely (LH+NPK, resp. NPK) dosahuje mnohem vyššího vzrůstu (Obr. 127a, b) než saláty ošetřené LH s NPK nebo jen NPK (Obr. 127c, d). Saláty uvedené na snímcích (Obr. 127a, b) mají krásnou světle zelenou barvu, jsou velké a hodně vyvinuté. Naproti tomu saláty uvedené na fotografiích (Obr. 127c, d) jsou malé, málo vyvinuté, a dokonce u vzorku 56 došlo k úhynu rostliny.

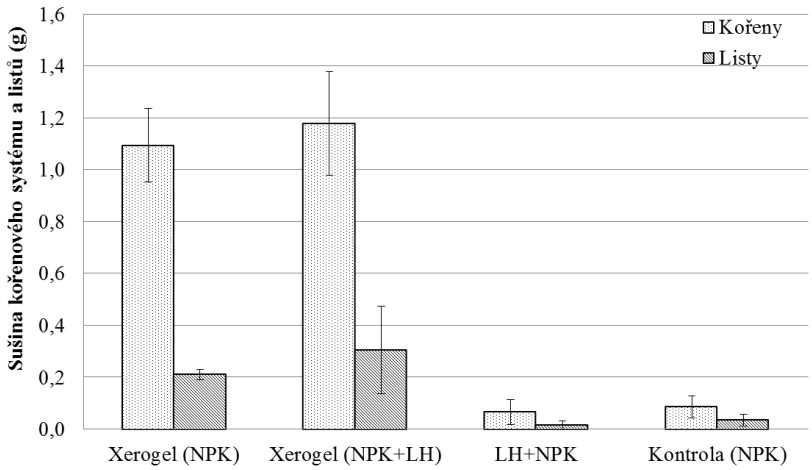


Obr. 127 Snímky z finální sklizně rostlin hlávkového salátu setého. Xerogel (NPK) (a), xerogel (NPK + LH) (b), LH + NPK (c) a kontrola (NPK) (d).

Jak u předešlých vzorků rostlin i hlávkový salát byl podroben fotografování, měření a vážení. Na uvedených snímcích (Obr. 128) jsou zobrazeny detaily kořenů pořízených ihned po sklizni salátu. Kořenový systém (Obr. 128a) byl vystaven působení xerogelů (NPK) a je tvořen silným hlavním kořenem, z něhož vyrůstá mnoho vedlejších kořenů. Kořenový systém (Obr. 128b) byl ošetřen lignohumátem draselným s NPK hnojivem. Na detailu tohoto snímku je zřejmé, že hlavní kořen je krátký a z něj vyrůstá několik vedlejších krátkých kořínků.

Obr. 128 Detail rozvětvení kořenového systému špenátu setého ošetřeného xerogelem (NPK) (a) a LH s NPK (b).

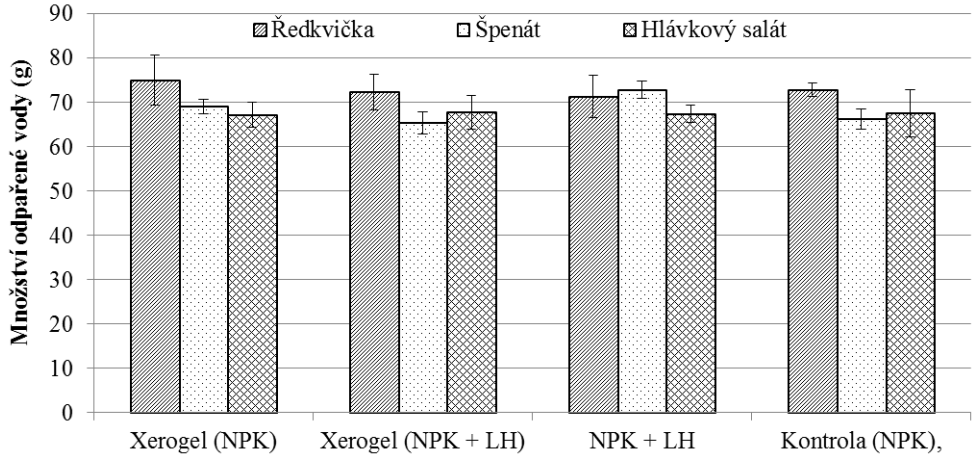
Výsledky získané ze sušiny kořenového systému a listů v závislosti na použitém přípravku jsou uvedeny v grafu (Obr. 129). Z něj je patrné, že oba druhy použitých xerogelů měly významný vliv na výnos rostlin, bohužel to se nedá tvrdit o přípravcích LH s NPK, respektive pouze NPK. Je zřejmé, že tyto přípravky v použitých množstvích neměly významný vliv na výnos rostlin.



Obr. 129 Přehled sušiny kořenů a listů hlávkového salátu v závislosti na aplikovaném přípravku.

9.2.4 Stanovení vlhkosti půdy skleníkových experimentů

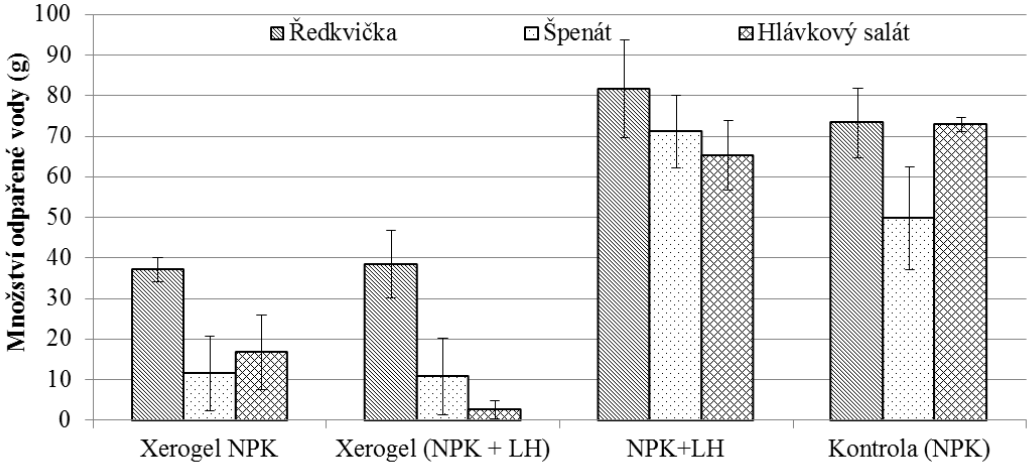
Další studovanou vlastností bylo určení zádrže vody v půdě. Během skleníkových experimentů bylo nezbytné dodávat do květináčů zálivku každé 2 dny, přitom byly květináče vždy váženy a voda byla doplňována tak, aby odpovídala počáteční hmotnosti. Z výsledků úbytku vody v květináčích byl sestaven graf (Obr. 130) závislosti změny půdní vláhy na aplikovaném přípravku.



Obr. 130 Průměrné hodnoty úbytku vody z půd jednotlivých vzorků v závislosti na použitém přípravku. Záznam z prvních 2 týdnů měření.

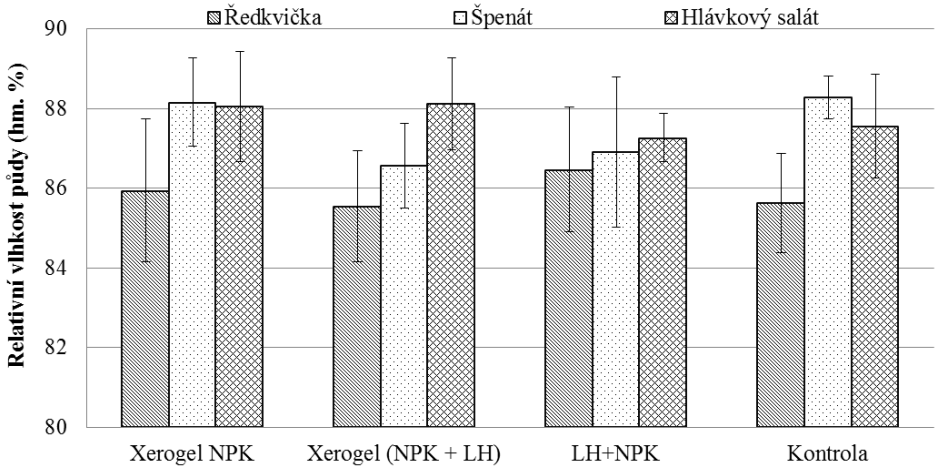
Z uvedených výsledků je zřejmé, že na začátku experimentu nehrál použitý materiál významnou roli v zádrži vody. V rámci statistické chyby je patrné, že všechny připravené vzorky ztrácely vláhu stejně. Na snímku (Obr. 48, kap. 6.3.4) jsou zobrazeny rostliny po 2 týdnech růstu, a protože rostliny ošetřené xerogely dosahují většího vzrůstu a celkově lepší kondice, předpokládalo se, že hlavní roli na tom bude mít právě zadržování vláhy v půdě.

Určitých odlišností v zadržování vody v půdě byly pozorovatelné v závěru skleníkových experimentů, kdy vzorky půdy ošetřené xerogely dosahovaly lepších hodnot v zádrži vody oproti ostatním. Výsledky z měření jsou zaznamenány v grafu (Obr. 131), ze kterého je zřejmé, že hydrogelové přípravky s časem zadržovaly více vody v půdě než ostatní použité přípravky (LH s NPK nebo pouze samotné NPK). Maximální ztráta vlhkosti u hydrogelových přípravků odpovídala v rámci chyby 49 g, naopak v případě ostatních vzorků tato hodnota byla v rámci chyby 93 g, tedy skoro 2krát taková jako v případě hydrogelů.



Obr. 131 Průměrné hodnoty úbytku vody z půd jednotlivých vzorků v závislosti na použitém přípravku. Záznam z 9 týdne měření.

Při ukončení skleníkových experimentů bylo provedeno závěrečné stanovení vlhkosti půdy v závislosti na použitých přípravcích. Jedná se o běžnou základní charakterizaci půdních vzorků po růstových experimentech. Po odebrání a dokonalém vysušení půdy byly vzorky zváženy a výsledné hodnoty byly vyneseny do grafu (Obr. 132). Z uvedeného grafu je zřejmé, že v rámci statistické chyby všechny vzorky půd dosahovaly stejných hodnot vlhkosti, z toho plyne, že hydrogelové přípravky neměly žádný významný vliv na zadržování vody půdy.

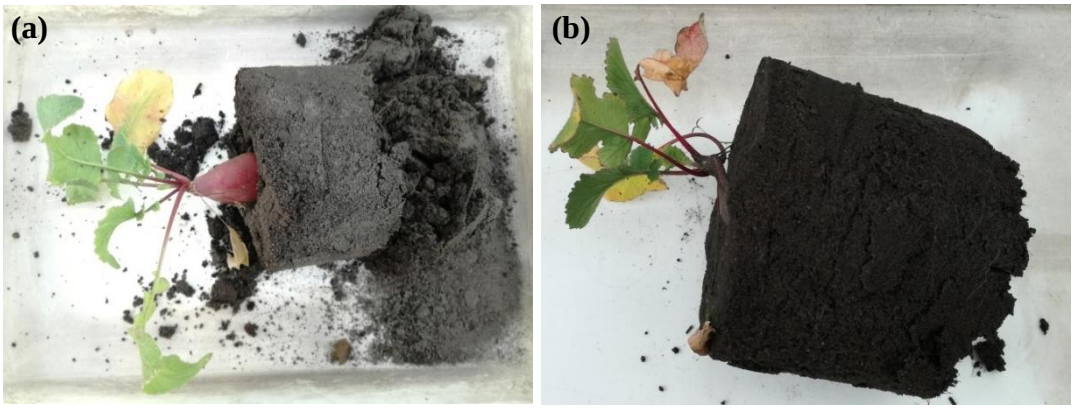


Obr. 132 Sumarizace hodnot vlhkosti půdy po skončení experimentů.

9.2.5 Objasnění dosažených výsledků z této kapitoly

Logicky bylo předpokládáno, že xerogely budou zvyšovat množství zadržené vody v půdě, což by se pozitivně projevilo i na kvalitě a vzrůstu rostlin. Bohužel, tyto předpoklady se nepotvrdily. Čím si tedy vysvětlit lepší vzrůst a kvalitu rostlin?

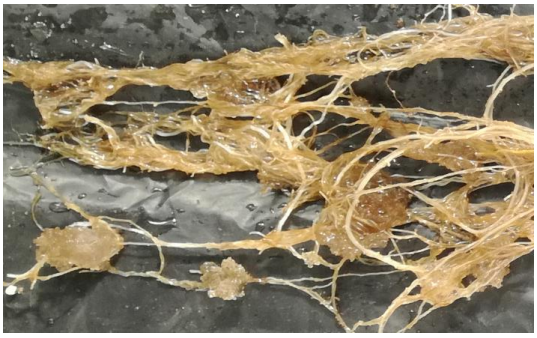
Při sklizni rostlin bylo odhaleno, že vzorky ošetřené hydrogely měly v první polovině květináče půdu vláčnou a kyprou (Obr. 133a) a v druhé polovině byla půda suchá. Naopak půda ošetřená NPK, respektive NPK s LH byla ve třech čtvrtinách květináče tvrdá a suchá (Obr. 133b). Zbylou třetinu tvořilo bahno, které zůstalo přilepené na dně nádoby.



Obr. 133 Vzorek půdy ošetřený xerogelem (a), vzorek půdy ošetřený NPK (b).

Dalším velmi pozoruhodným zjištěním bylo, že po opatrném vyjmutí rostliny z půdy, byl její kořenový systém obalený velkým množstvím xerogelů. Zejména to bylo patrné v případě kořenů hlávkového salátu a špenátu setého (Obr. 134).

Hydrogelové přípravky měly za následek nejen postupné uvolňování aktivních látek a vody přímo v požadovaném místě, tedy v oblasti kořene, ale rovněž zastávaly funkci v okysličování půdy, neboť díky schopnosti sorbovat vodu a postupně ji uvolňovat dochází k vytváření porézní struktury půdy. Navíc bylo zjištěno, že nemá smysl aplikovat xerogely do hloubky nižší než 10 cm, protože, jak je patrné z fotografie (Obr. 133a), do nižších vrstev květináče se již zálivka nedostala.



Obr. 134 Hydrogely zapletené v kořenovém systému hlávkového salátu po omytí vodou.

Na závěr je důležité zmínit, že přídavek lignohumátu draselného v použité koncentraci nevedl ke zvýšení výnosu rostlin. To je nejspíš zapříčiněno příliš nízkými koncentracemi LH v hydrogelových přípravcích. V případě vzorků LH s NPK nebylo postupováno dle doporučení výrobce, protože sice byla využita správná koncentrace přípravku, ale bohužel pouze jednou na začátku experimentu, avšak výrobce doporučuje opakované použití v prvních stádiích růstu, a pak i během něj. Bohužel experimenty již nebylo možné znovu zopakovat kvůli končící stáži.

9.3 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 $[NO_3^-]$–N nebo amoniové kationtů v podobě $[NH_4^+]$–N. V poslední řadě bylo stanoveno množství fosforu v půdě tzv. Colwell P testem.

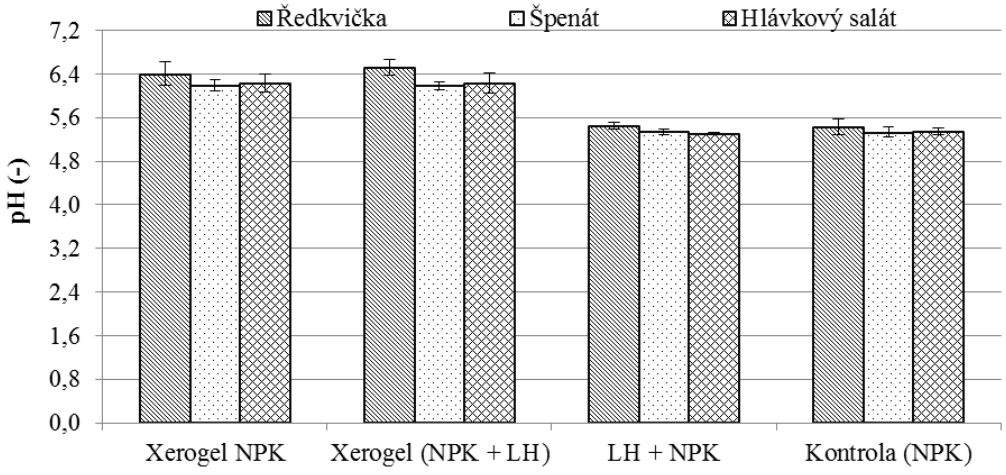
9.3.1 Stanovení pH ve vzorcích půdy

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 [188].

Hodnoty pH mají důležitou roli v pěstování rostlin, neboť jsou-li půdy příliš alkalické, potom v takových podmínkách nevzejdou rostliny, které preferují kyselejší podmínky (Azalka, Rododendron, Fotergila) 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 [189]. Neutrální půdy jsou díky svému pH příznivé pro tvorbu biologické aktivity půdy [188].

V grafu (Obr. 135) 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 [189], 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. 135 Průměrné hodnoty pH půd v závislosti na aplikovaném přípravku. Vzorky půd po sklizni rostlin.

9.3.2 Stanovení elektrické vodivosti ve vzorcích půdy

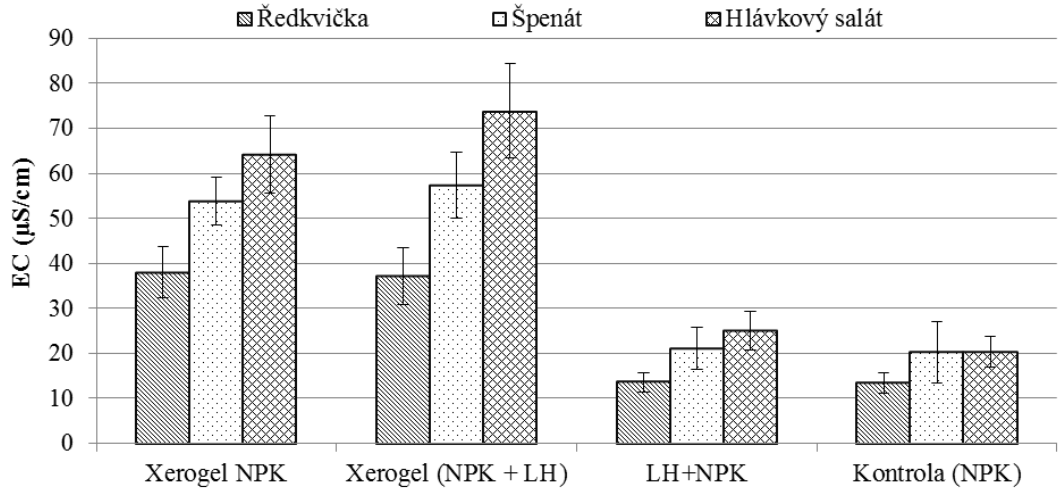
Dalším studovaným parametrem odebraných vzorků půd byla elektrická vodivost. Její hodnota určuje tzv. salinitu půdy, tedy míru zasolení půdy. To může být způsobeno přirozeně nebo činností člověka. Salinita negativně ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti půdy a negativně ovlivňuje příjem vody do rostlin. 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 µS/cm [190].

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 µS/cm, potom rostliny plně prospívají bez jakýchkoliv problémů, hovoříme o ideálním stavu půdy. Je-li vodivost v rozmezí 2 000–4 000 µS/cm, potom jsou rostliny citlivější a přestávají být plně prospívající. Půdy s elektrickou vodivostí v rozmezí 4 000–8 000 µS/cm způsobují neprospívání většiny rostlin, přežijí jen některé druhy. Má-li vodivost 8 000– 16 000 µS/cm, potom je schopna přežívat pouze určitá úzká skupina rostlin a při hodnotách vyšších nad 16 000 µS/cm již žádné rostliny nejsou schopny růstu [190].

V grafu (Obr. 136) 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 µS/cm. Dosažené hodnoty vodivostí 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 přídavkem LH zvyšovaly hodnoty vodivostí, avšak v rámci statistické chyby se oba typy xerogelů chovaly stejně. Naopak nižších hodnot vodivostí 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 zvýšeni velmi zanedbatelné.



Obr. 136 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.

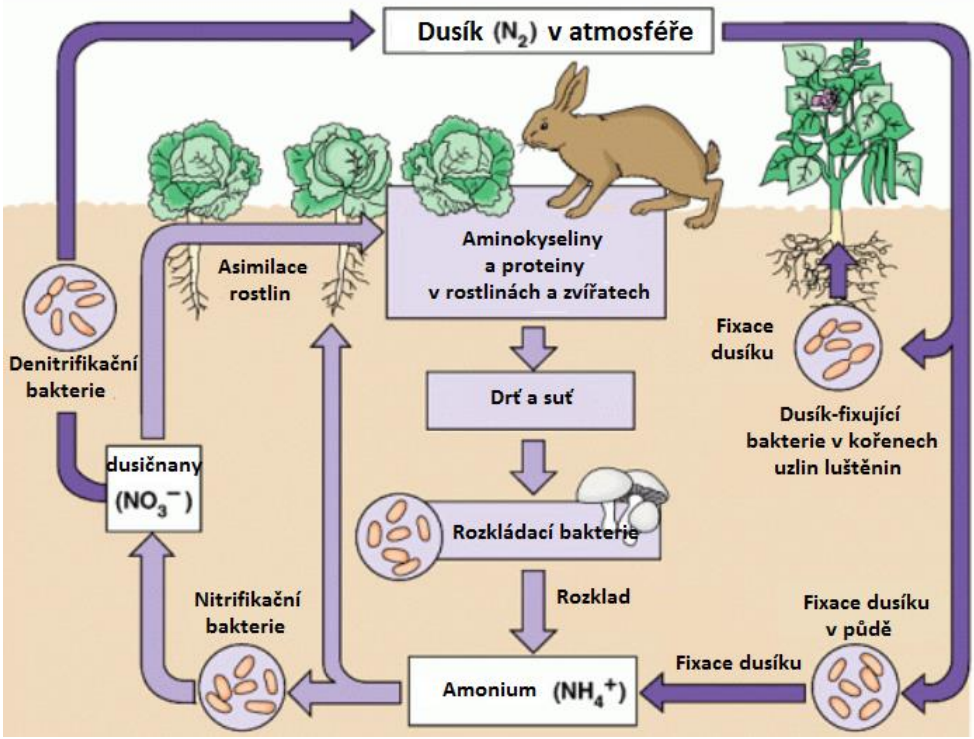
9.3.3 Stanovení dusíku v půdě ve formě $[NO_3^-]$–N a $[NH_4^+]$–N

V následujícím kroku bylo stanoveno množství dusíku v půdě vázaného v podobě $[NO_3^-]$–N a $[NH_4^+]$–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 zaměřen na pozemní (terestriální) ekosystém, následující odstavce budou věnovány tomuto tématu.

Terestriální ekosystém (Obr. 137) 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 [191].

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 [192].



Obr. 137 Schéma cyklu dusíku v terestriálním ekosystému [191].

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 [192].

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 [191].

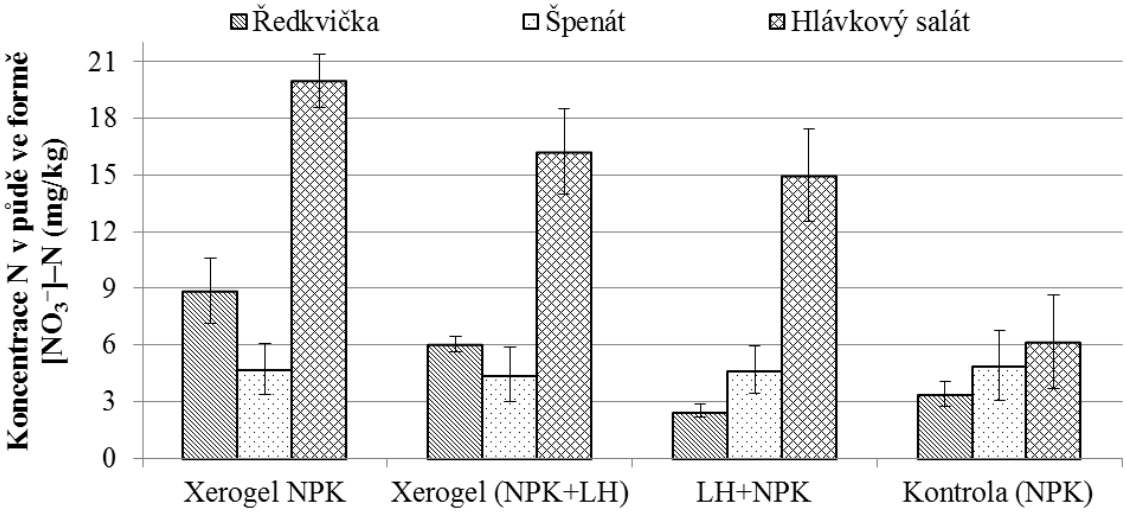
Dusík hraje významnou roli při tvorbě nadzemní části zelených rostliny. Podílí se na růstu výhonků a tvorbě listů [193]. Příznivě ovlivňuje také produkci rostlin a jejich kvalitu [194]. Nedostatek dusíku naopak způsobuje zpomalení růstu nadzemní části rostliny [195], žloutnutí starých listů, jejich odumírání a opadání. Plody jsou při jeho nedostatku malé [196]. Nadbytek dusíku se projevuje velkými, vodnatými listy, tmavozelené až namodralé barvy [193]. Stejně tak se podepisuje na snížené kvalitě plodů. Na nadbytek dusíku jsou v raném stádiu vegetace citlivé převážně rostliny salátu, zelí, květáku, brukve atd. [197].

V publikaci [198] bylo uvedeno, že limitní tolerance dusíku vázaného v půdě ve formě $[NO_3^-]$–N a $[NH_4^+]$–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 $[NO_3^-]$–N v ošetřených půdách

Maximální koncentrace $[NO_3^-]$–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 [199]. Uvedené limity koncentrací udávají maximální možnou koncentraci, která je pro člověka ještě nezávadná.

Výsledky koncentrací $[NO_3^-]$–N ve vzorcích půdy jsou zobrazeny v grafu (Obr. 138). Z grafu je patrné, že superabsorbenty dosahují v případě ředkvičky seté a hlávkového salátu vyšších koncentrací $[NO_3^-]$–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 $[NO_3^-]$–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 [195] hmotností sušiny nadzemní části listů a kořenového systému (Tab. 20), kde právě vzorky špenátu odpovídají 1, tedy rovnoměrnému zastoupení hmotností. To je zřejmé i z grafů (Obr. 123, Obr. 126 a Obr. 129).



Obr. 138 Koncentrace dusíku v půdě ve formě $[\mathbf{NO_3^-}]$–N v závislosti na použitém přípravku.

V případě ředkvičky ošetřené hydrogely nabývala maximální průměrná koncentrace $[NO_3^-]$–N hodnot 9 mg/kg, což bylo 3krát více než v případě kontrolních vzorků. Pro hlávkový salát ošetřený xerogely byla maximální průměrná koncentrace $[NO_3^-]$–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 nitritačních bakterií. Navíc nedochází ke zbytečné intoxikaci půdy dusičnany, neboť naměřené hodnoty koncentrací $[NO_3^-]$–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. 20 Poměry hmotností sušiny nadzemní části rostliny a kořenů.

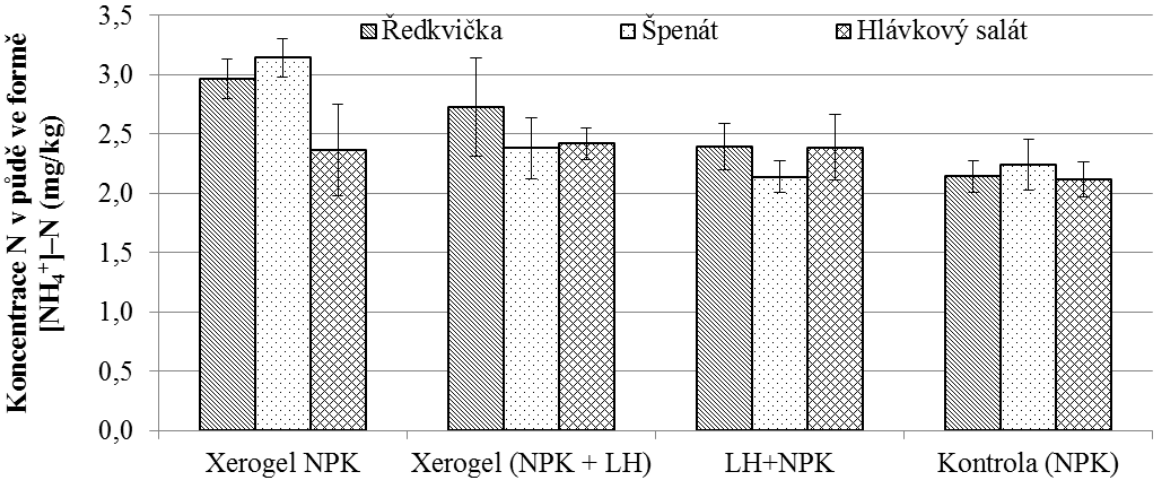
	Ředkvička	**Špenát**	**Hlávkový salát**
Xerogel (NPK)	0,3	1,3	5,2
Xerogel (NPK+LH)	0,4	1,0	3,9
LH+NPK	0,5	1,0	4,1
Kontrola (NPK)	0,6	1,0	2,5

Výsledky stanovení v ošetřených půdách $[\mathbf{NH_4^+}]$–N

Jak již bylo uvedeno v odstavcích výše, dusík je v půdě vázán také ve formě amoniových iontů $[NH_4^+]$–N, jejichž koncentrace byla rovněž stanovena. Výsledky byly vyneseny do grafu (Obr. 139), z nichž je zřejmé, že mírně vyšších koncentrací $[NH_4^+]$–N bylo dosaženov 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 $[NH_4^+]$–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 $[NH_4^+]$–N na další produkty zejména $[NO_3^-]$–N. Vznik škodlivých (NO_2^-) nebo nitroaminů v případě xerogelových přípravků byl vyloučen na

základě senzitivních testů (Obr. 119). Pokud by byly hydrogely toxické, nedošlo by k vzejití tolika zasetých semen a toxicita by se negativně projevila i na samotných rostlinách.



Obr. 139 Koncentrace dusíku v půdě ve formě $[\mathbf{NH_4^+}]$–N v závislosti na použitém přípravku.

Z uvedených grafů (Obr. 144 a Obr. 145) je rovněž zřejmé, že lignohumát draselný nemá významný vliv na produkci $[NH_4^+]$–N a $[NO_3^-]$–N. Alespoň to nebylo prokázáno pro tyto použité koncentrace.

9.4 Inkubační testy

Inkubační testy slouží pro srovnání chování půdy ošetřené přípravky bez přítomnosti rostlin. Pro inkubační testy byly zvoleny superabsorbenty a lignohumát draselný jako v případě skleníkových experimentů. Navíc byly pro tyto testy využity dvě koncentrace, koncentrace využívaná pro skleníkové experimenty (označené dále v textu 1) a koncentrace 5krát vyšší (označené dále v textu 2).

Na základě dvou replikačních testů je možné posoudit, jak látky v půdě působí bez přítomných rostlin, jaké koncentrace plynů (N_2O, CO_2) či dusíku ve formách $[NH_4^+]$–N a $[NO_3^-]$–N v půdě vzniká. Rovněž byla provedena základní charakterizace půd, měřením pH a elektrické vodivosti.

Testy s 5násobným zvýšením koncentrace přípravku byly realizovány za účelem studia vlastností a dopadů přípravků na půdu, zejména z negativního hlediska. Ty by se totiž projevily dvěma způsoby. Buď vysokými hodnotami koncentrací plynů v půdě a překročením limitů množství dusíku vázaného ve formě $[NH_4^+]$–N a $[NO_3^-]$–N nebo naopak velmi nízkými hodnotami těchto složek. V obou extrémních případech by to znamenalo, že v půdách zaniká život, tolik důležité bakterie a mikroorganismy nezbytné pro funkci půdy (růst a vývoj rostlin). Docházelo by k intoxikaci půdy.

9.4.1 Stanovení oxidu uhličitého a oxidu dusného

Půdu tvoří látky ve všech skupenských fázích (tuhá, kapalná a plynná). Tuhá fáze představuje pevné částice minerálního (matečná hornina) a organického (odumřelé rostliny, živočichové a organismy žijící v půdě) původu. Kapalnou fázi tvoří půdní voda a plynnou fázi tvoří půdní plyny. Ty umožňují dýchání organismů a zároveň se podílí na oxidačních procesech v půdě. Složení tohoto plynu není shodné s atmosférickým vzduchem, neboť je chudší na kyslík, zato bohatší na oxid uhličitý. To je způsobeno dýcháním organismů a kořenů rostlin [200].

Dusík je klíčový prvek, který řídí mikrobiální procesy v půdě, závisí od něj biologické aktivity mikroorganismů, podílí se na tvorbě biomasy a funkci půdy, růstu a kvalitě rostlin. Dusík (N_2) respektive oxid dusný (N_2O) vzniká v důsledku redukce dusičnanových (NO_3^-) a dusitanových (NO_2^-)

aniontů. Tímto procesem je dusík navracen zpět do atmosféry [201]. Koloběh atmosférického dusíku byl podrobně popsán v kapitole 9.3.3.

V průběhu roku koncentrace dusíku v půdě kolísá. Na jaře v důsledku oteplování dochází ke zvýšení mikrobiální aktivity, tedy produkce dusíku roste, stejně tak s aplikací dusíkatých látek (NPK či ledek amonný). V tomto období dosahuje dusík v půdě maximálních hodnot. Naopak nejnižších hodnot dosahuje dusík v letních měsících, neboť je z půdy vyčerpáván rostlinami, a navíc je přerušen proces hnojení a umělého dodávání živin do půdy. Na podzim, v období sklizně, tlení odumřelých zbytků rostlin, zvýšené vlhkosti a přijatelnými teplotami se dusík dostává opět na své maximum. S poklesem teploty v zimních měsících dochází k ustálení hodnot dusíku v půdě, neboť je ukončena aktivita mikroorganismů a bakterií v půdě [193].

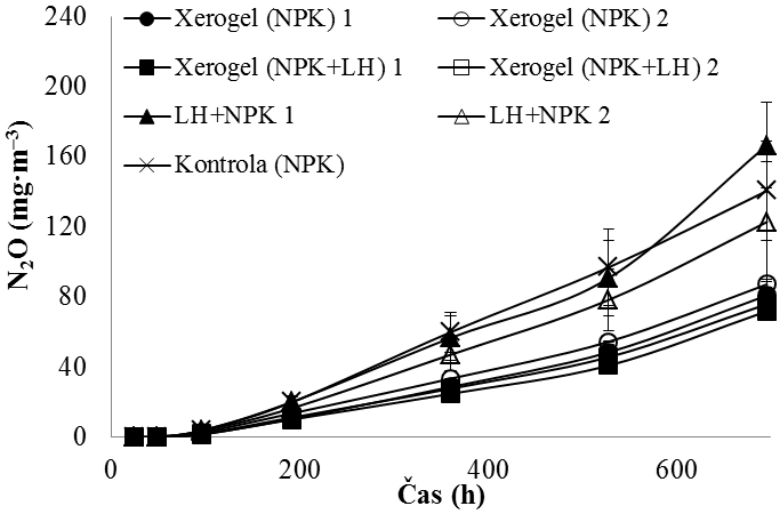
Dalším studovaným plynem v půdě je oxid uhličitý, který se podílí na respiraci rostlin a mikroorganismů v půdě, neboť se podílí na aerobních i anaerobních procesech v půdě. Vzniklý oxid uhličitý přechází do atmosféry nebo se ukládá v půdní biomase. V publikaci [202] byla rovněž uvedena důležitost oxidu uhličitého pro funkci fotosyntézy a jeho přeměně na organické látky, které se podílí na výstavbě těla rostlin.

Ovšem je nutné podotknout, že oba tyto plyny se přispívají k tvorbě skleníkových plynů, zejména oxid dusný. Proto je důležité hlídat množství těchto plynů v půdách, které by negativně přispívaly k oteplování povrchu Země. Publikace [203] uvádí, že skleníkové plyny přesněji oxid dusný vzniká až z 60 obj. % v důsledku zemědělské produkce, čímž dochází k poklesu indikátoru organické hmoty, kterým je poměr C/N.

V grafu (Obr. 140) jsou znázorněny výsledky inkubačních testů. Plynovou chromatografií byly měřeny emise oxidu dusného z půd ošetřených produkty (xerogel s NPK, respektive s NPK a LH, kombinace přípravků NPK s LH a kontrola ošetřená pouze NPK). Přípravky byly použity ve dvou koncentracích (koncentrace dle skleníkových experimentů – ozn. 1 a replikační experimenty s 5násobným zvýšením koncentrace – ozn. 2).

Z uvedených výsledků (Obr. 140) vyplývá pozitivní vliv superabsorbentů na snížení emise N_2O, tedy hydrogelové přípravky nepřispívají ke vzniku nežádoucích skleníkových plynů, což je podmíněno tím, že v půdě nedochází při nitrifikaci ke vzniku oxidu dusného, nýbrž jen molekul dusíku, které jsou navraceny do atmosféry. Srovnáním výsledků emise N_2O mezi kontrolním vzorkem a vzorkem xerogelů s obsahem NPK (1) respektive NPK a LH (1) došlo k poklesu plynu o 38 obj. %, v případě vyšších koncentrací (2) došlo dokonce k 46% poklesu emise N_2O. Z toho vyplývá, že i při aplikování 5násobné koncentrace xerogelů (obou typů) do půdy dochází k eliminaci negativních dopadů na životní prostředí.

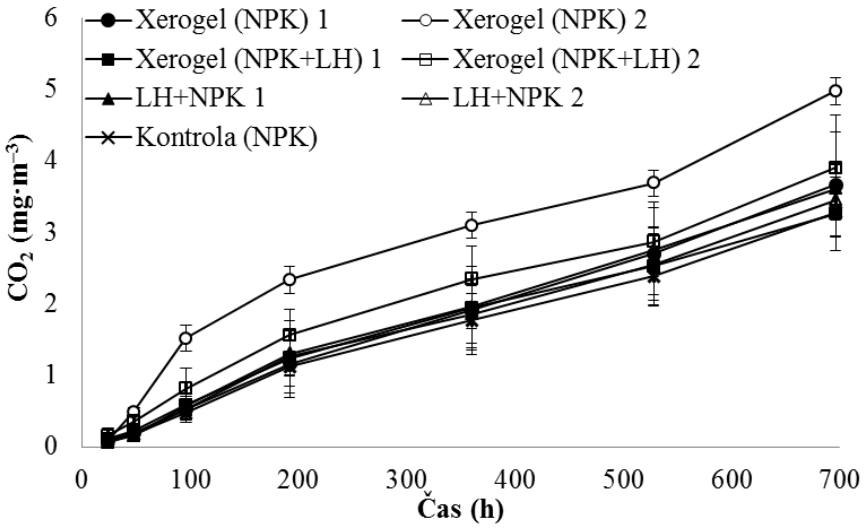
V případě aplikace NPK s LH (1) je patrný rovněž pokles emisí N_2O, ale ten již není tak výrazný, jedná se pouze o 14% pokles. Naopak v případě zvýšené koncentrace přípravku (2) došlo naopak ke 14% zvýšení emise N_2O vůči kontrolnímu vzorku. Proto je nutné dodržovat správné dávkování dle instrukcí výrobce.



Obr. 140 Míra emise N_2O v závislosti na čase. Použité koncentrace – 1 hm. % (ozn. 1) a 5 hm. % (ozn. 2).

V grafu (Obr. 141) jsou znázorněny výsledky emise CO_2 inkubačních testů provedených pro hydrogelové materiály a komerční přípravek lignohumát draselný. Z grafu vyplývá, že použité přípravky mají pozitivní vliv na zvýšení emisí CO_2. Pozitivní je z toho důvodu, že jak již bylo uvedeno výše, oxid uhličitý se podílí na anaerobních procesech v půdě, čím vyšší hodnota je v půdě obsažena, tím více mikroorganismů daná půda obsahuje. Půdy jsou tzv. živé, a úrodné.

Avšak v případě koncentrací (1) byl tento nárůst pouze nepatrný ve srovnání s kontrolním vzorkem, činil 6–9 obj. %. Naopak výraznějšího navýšení emisí CO_2 je zřejmé pro hydrogelové materiály a jejich koncentrace (2). V případě xerogelu s přídavkem NPK a LH došlo k navýšení emisí o 12 obj. %, v případě xerogelu s obsahem pouze NPK činilo toto navýšení více než 51 obj. %.



Obr. 141 Míra emise CO_2 v závislosti na čase. Použité koncentrace – 1 hm. % (ozn. 1) a 5 hm. % (ozn. 2).

Na základě dosažených výsledků je zřejmé, že xerogelové produkty mají pozitivní (respektive negativní) vliv na tvorbu CO_2 (respektive N_2O). Těmito testy bylo potvrzeno, že xerogely nejsou toxické, stejně tak přípravek lignohumátu draselného, u kterého je důležité dodržovat správné dávkování dle informací uvedených na obale.

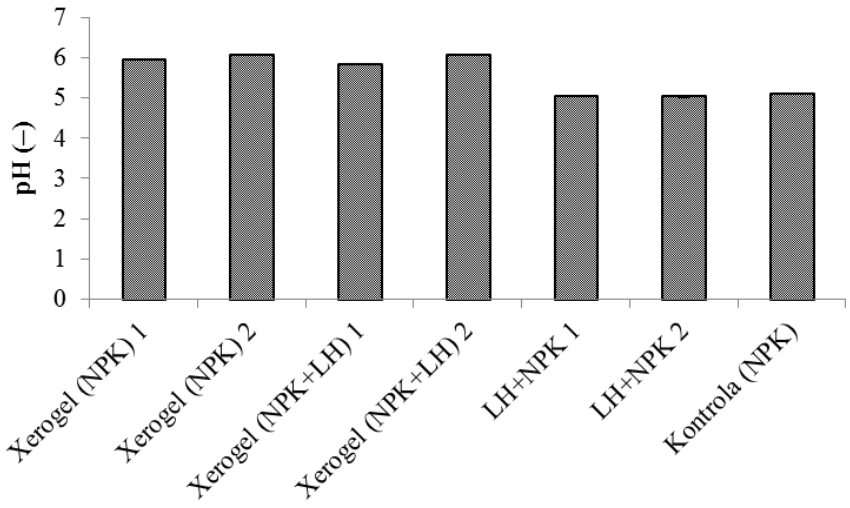
9.4.2 Stanovení pH a elektrické vodivosti

Po ukončení inkubačních experimentů byla provedena základní charakterizace půd ošetřených aplikovanými přípravky. Jako první bylo provedeno stanovení pH a elektrické vodivosti vzorků půd.

Stanovení pH půd v závislosti na druhu ošetření

V uvedeném grafu (Obr. 142) jsou zobrazeny výsledky hodnot pH vzorků půd extrahovaných po ukončení inkubačních experimentů. Z výsledků je zřejmé, že kontrolní půda nabývala hodnot pH 5, tedy použitý vzorek půdy byl kyselého charakteru. Hodnot pH 5 bylo dosaženo i při ošetření půdy komerčním lignohumátem draselným. Z grafu je rovněž patrné, že ani použitím vyšších koncentrací (2) LH, nedocházelo k zneutralizování půd, ačkoli hodnota pH 1 hm. % roztoku LH odpovídá 9,49±0,04.

Naopak půdy ošetřených hydrogelovými přípravky nabývaly hodnoty pH 6. Xerogely způsobily mírné zvýšení hodnoty pH, díky čemuž byly vzorky půd zařazeny do skupiny velmi slabě kyselých až neutrálních. Navíc je z grafu pozorovatelný mírný nárůst pH u vzorků, u nichž byla použita vyšší koncentrace (2) xerogelu.



Obr. 142 Hodnoty pH vzorků půd v závislosti na použitém přípravku.

Na základě těchto testů je zřejmé, že xerogely pozitivně působí na změny pH půdy, neboť vytváří pro rostliny, bakterie a další mikroorganismy vhodné podmínky pro život, růst a celkový vývoj. Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě skleníkových experimentů, čímž byl opravdu potvrzen pozitivní vliv xerogelů na pH půdy.

Stanovení elektrické vodivosti půd v závislosti na druhu ošetření

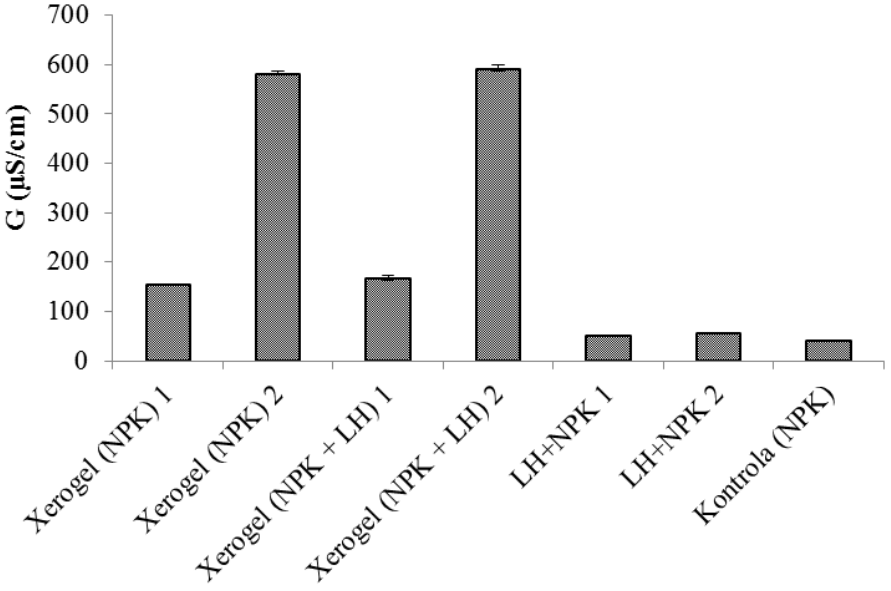
Výsledky elektrické vodivosti extrahovaných půd z inkubačních testů jsou znázorněny v grafu (Obr. 143), z něhož je zřejmé, že všechny hodnoty vodivostí se pohybují v rozmezí 0–2 000 μS/cm, což znamená dle publikace [190],že rostliny v takovém prostředí plně prospívají (kap. 9.3.2).

Kontrolní půda dosahovala hodnoty elektrické vodivosti kolem 40 μS/cm, půdy ošetřené LH s NPK (1) způsobovaly navýšení salinity o 27,5 % a v případě navýšení koncentrace (2) došlo k nárůstu vodivosti o 42,5 % vůči kontrole. Navýšení elektrické vodivosti v obou případech bylo způsobeno vyšší koncentrací draselných iontů obsažených v lignohumátu draselném.

Půdy ošetřené xerogelovými přípravky vykazovaly vyšší hodnoty elektrické vodivosti, oproti kontrole šlo o navýšení v případě xerogelu s NPK (1) o 285 % a v případě xerogelu s LH a NPK (1) dokonce o 318 %. Toto navýšení je způsobené látkami, kterými jsou xerogely připravovány a které

obsahují draselné ionty, zejména jde o neutralizační činidlo v podobě hydroxidu draselného a síťovací činidlo v podobě peroxodisulfátu draselného. Při aplikaci xerogelových produktů v 5násobných koncentracích (2) došlo ještě k dalšímu navýšení hodnot elektrické vodivosti, které se pohybovaly kolem hodnoty 600 μS/cm.

Z uvedených výsledků vyplývá, že xerogelové produkty výrazně ovlivňují elektrickou vodivost půd, ovšem i v případě výrazné zvýšení koncentrace nedojde k překročení hranice 2 000 μS/cm, které jsou hraniční pro růst a vývoj rostlin. Stejný trend v elektrických vodivostech půd byl pozorovaný i v případě skleníkových experimentů, u nichž rovněž platilo, že hydrogelové produkty lépe uvolňují ionty a předávají je do půdy, respektive do rostliny.



Obr. 143 Elektrická vodivost v závislosti na vzorků půdy z inkubačních testů.

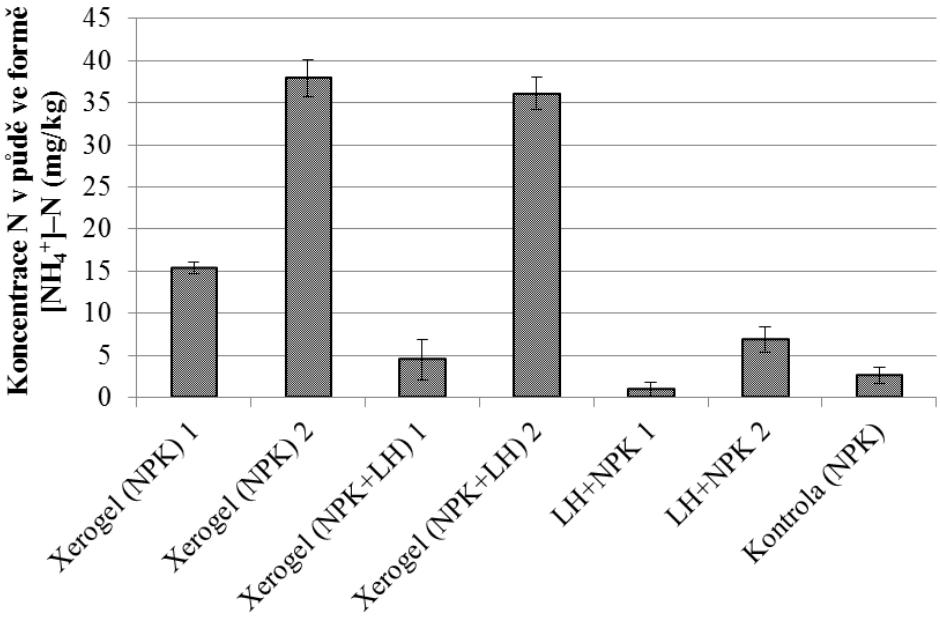
9.4.3 Stanovení dusíku v půdě ve formě $[NO_3^-]$–N a $[NH_4^+]$–N

Půdy inkubačních experimentů byly rovněž podrobeny stanovení obsahu dusíku v půdě vázaného ve formě $[NO_3^-]$–N a $[NH_4^+]$–N. Na základě dosažených výsledků je možné porovnat, jak se chovají jednotlivé půdy v závislosti na jejich ošetření a jak se tyto produkty budou chovat bez přítomnosti rostlin.

Stanovení dusíku v půdě ve formě $[NH_4^+]$–N

Výsledky koncentrace dusíku vázaného ve formě $[NH_4^+]$–N v půdách inkubačních testů jsou znázorněny v grafu (Obr. 144). Z výsledků je zřejmé, že nejvyšších hodnot koncentrace vázaného dusíku v podobě $[NH_4^+]$–N bylo dosaženo pro produkty hydrogelových materiálů (NPK, respektive LH s NPK), a to pro obě použité koncentrace (1,2). Naopak velmi nízkých hodnot koncentrací $[NH_4^+]$–N bylo dosaženo v případě komerčního přípravku LH s NPK (1), jehož koncentrace $[NH_4^+]$–N byla dokonce mnohem nižší než v případě kontrolní půdu.

Z těchto výsledků vyplývá, že většina dusíku v podobě $[NH_4^+]$–N byla přeměna za uplynulý čas experimentu na dusík vázaný na dusičnanové anionty $[NO_3^-]$–N. Stanovené hodnoty koncentrací se pohybovaly maximálně kolem hodnoty 40 mg/kg, což znamená, že přípravky využité v koncentracích (1 a 2), můžou být využity k hnojení, neboť zdaleka nepřevyšují povolený limit (kap. 9.3.3).

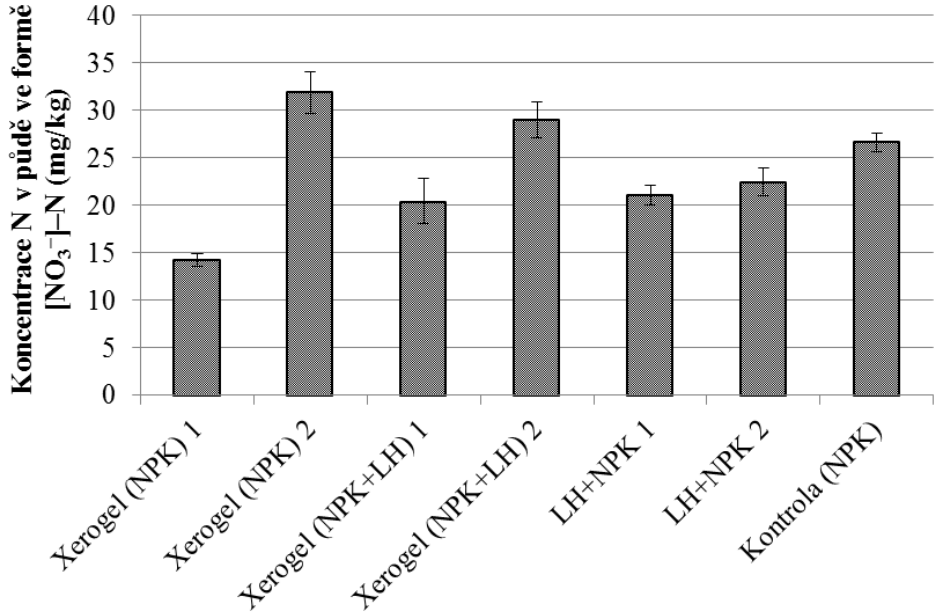


Obr. 144 Koncentrace dusíku v půdě ve formě $[\mathbf{NH_4^+}]$–N v závislosti na typu ošetření.

Stanovení dusíku v půdě ve formě $[\mathbf{NH_4^+}]$–N

Výsledky koncentrace dusíku vázaného ve formě $[NH_4^+]$–N jsou znázorněny v grafu (Obr. 145). Z uvedených výsledků je zřejmé, že všechny použité přípravky mají významný vliv na produkci nitrifikačních bakterií v půdě, což je pozitivní pro tvorbu biomasy a také pro výnosnost a kvalitu rostlin.

Porovnáním výsledků koncentrací $[NH_4^+]$–N (Obr. 144) a koncentrací $[NO_3^-]$–N (Obr. 145) bylo potvrzeno, že v případě nízkých koncentrací dusíku vázaného na jeden druh iontu, došlo k navýšení koncentrace dusíku pro druhý typ iontu. Stále by mělo platit, že celková koncentrace dusíku, ať už vázaného ve formě amoniových nebo dusičnanových aniontů, nesmí překročit povolené limity, které nejsou ještě škodlivé pro životní prostředí nebo jsou zdravotně nezávadné při jejich absorpci do těla rostlin.



Obr. 145 Koncentrace dusíku ve formě $[\mathbf{NO_3^-}]$–N v závislosti na typu ošetření.

10 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 projevily 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 prenatálního stádia rostlin, neboť došlo ke vzrůstu 60 a více % semen, které již po 14 dnech vykazovaly obecně lepší vlastnosti a na pohled se jevily 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 μS/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 limit 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 disertační 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.

11 POUŽITÁ LITERATURA

[1] TAN, K.H. *Humic matter in soil and the environment principles and controversies: genesis, composition, reactions*. 2nd Ed. New York: M. Dekker, 1994, xiii, 496 s. ISBN 08-247-4862-X.

[2] STEVENSON, F.J. *Humus chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. 2nd Ed. New York: Wiley, 1994, 512 s. ISBN 978-0-471-59474-1.

[3] GHABBOUR, E. A., KHAIRY, A. K., CHENEY, D. P., GROSS, V., DAVIES, G., GILBERT, G.T. and ZHANG, X. Isolation of humic acid from the brown alga Pilayella littoralis. *Journal of Applied Phycology*. 1994, vol. 6, s. 459–468. DOI: 10.1007/BF 02182399.

[4] RADWAN, A., DAVIES, G., FATAFTAH, A., GHABBOUR, E. A., JANSEN, S. A., WILLEY, R. J. and ZHANG, X. Isolation of humic acid from the brown algae Ascophyllum nodosum, Fucus vesiculosus, Laminaria saccharina and the marine angiosperm Zostera marina. *Journal of Applied Phycology*. 1997, vol. 8, issue 6, s. 553–562. DOI: 10.1007 /BF02186335.

[5] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 4. aktualiz. vyd. Praha: VŠCHT, 2009, viii, 579 s. ISBN 978-80-7080-701-9.

[6] VESELÁ, L., KUBAL, M., KOZLER, J., INNEMANOVÁ, P. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*. 2005, r. 99, s. 711–717.

[7] SKOKANOVÁ, M. a DERCOVÁ, K. Humínové kyseliny. Povod a štruktúra. *Chemické listy*. 2008, r. 102, s. 262–268.

[8] PENA-MÉNDEZ, E. M., HAVEL, J., PATOČKA, J. Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*. 2005, vol. 3, issue 1, s. 13–24. ISSN 1214-0287.

[9] SPRENGEL, C. *Die Bodenkunde oder die Lehre vom Boden, nebst einer vollständigen Anleitung zur chemischen Analyse der Ackererden und den Resultaten von 180 chemisch untersuchten Bodenarten aus Deutschland, Belgien, England, Frankreich, d. Schweiz, Ungarn, Rußland, Schweden, Ostindien, Westindien u. Nordamerika. Ein Handbuch für Landwirthe, Forstmänner, Gärtner, Boniteure u. Theilungscommissäre*. Leipzig: Immanuel Müller, 1844, 587 s. ISBN-10: 0267029772.

[10] BERZELIUS, J., J. *Lehrbuch der Chemie: Sechster Band*. Dresden und Leipzig: der Arnoldischen Buchhandlung, 1837, 591 s.

[11] ODEN, S. Humic acids. *Kolloidchem. Beih*. 1919, vol. 11, issue 75.

[12] KUMADA, K. *Chemistry of soil organic matter*. New York: Elsevier, 1987, 241 s. ISBN 04-449-8936-6.

[13] KLUČÁKOVÁ, M. a M. PEKAŘ. Conformational changes in humic acids in aqueous solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008, vol. 318, issue 1–3, s. 106-110. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.12.023.

[14] SCHNITZER, M a S. U KHAN. *Humic substances in the environment*. New York: M. Dekker, 1972, vii, 327 s. ISBN 08-247-1614-0.

[15] ACHARD, F. K. Chemische Untersuchung des Torfs. *Chemische Annalen für die Freunde der Naturlehre von L. Crell*. Leipzig: Müller. 1784, 571 s.

[16] GHABBOUR, E. A a S. U. KHAN. *Understanding Humic Substances: Advanced Methods, Properties and Applications*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1972, 286 s. ISBN 08-540-4799-9.

[17] DAVIES, G. a E. A. GABOUR. *Humic substances, astructure, properties and uses*. Cambridge: The RSC, 1999, 260 s. ISBN 0-85404-704-2.

[18] BURSÁKOVÁ, P. *Hydration of biomolecules*. Brno, 2009. Teze dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce doc. Ing. Jiří Kučeřík.

[19] WAKSMAN, S.A. *Humus*. 2nd Ed., Baltimore: Wiliam and Wilkins, 1938, 526 s.

[20] GHABBOUR, E.A. a G. DAVIES. *Humic Substances: Nature's Most Versatile Materials*. New York: Taylor and Francis, Inc., 2004, 416 s. ISBN 0-203-59493-2.

[21] KLÖCKING, Renate a B. HELBING. *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*. 1st ed. Editor Alexander Steinbüchel, Robert H Marchessault. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, 1132 s., 2 sv. ISBN 35-273-1154-8.

[22] SENESI, N., PROVENZANO, M. R. a G. BRUNETTI. Characterization, differerentiation and classification of humic substances by fluorescence spektroskopy. *Soil Science*. 1991, vol. 152, issue 4, s. 259–271. DOI: 10.1097/00010694-199110000-00004.

[23] SEDLÁČEK, Petr. *Hydrogely huminových kyselin – experimentální model i aplikační forma*. Brno, 2009. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

[24] THIEL, K. D., KLÖCKING, R. a B. HELDING. *Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt Orig* A. 1976, vol. 234, s. 159–169.

[25] KLÖCKING, Renate, M. SPRÖSSIG, P. WUTZLER, K.-D. THIEL a B. HELBIG. Antiviral wirksame Huminsäuren und huminsäureähnliche Polymere 1. *Physikalische Medizin, Rehabilitationsmedizin, Kurortmedizin*. 1983, vol. 35, issue 02, s. 95–101. DOI: 10.1055/s-2008-1065760.

[26] BARTOVSKÁ, Ludmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.

[27] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.

[28] MANIATIS, Tom, E FRITSCH a Joseph SAMBROOK. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, x, 545 s. ISBN 978-0879691363.

[29] SMILEK, Jiří. *Studium reaktivity biopolymerů*. Brno, 2016. Pojednání k dizertační práci. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická. Vedoucí práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

[30] RENN, D. W. Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *Industrial*. 1984, vol. 23, issue 1, s. 17-21. DOI: 10.1021/i300013a004.

[31] TRIVEDI, T. J., SRIVASTAVA, D. N., ROGERS, R. D. a A. KUMAR. Agarose processing in protic and mixed protic–aprotic ionic liquids: dissolution, regeneration and high conductivity, high strength ionogels. *Green Chemistry*. 2012, vol. 14, issue 10, s. 259–271. DOI: 10.1039/c2gc35906e.

[32] SAMBROOK, J. a D. W. RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001. ISBN 978-0-87969577-4.

[33] MORRIS, E. R., NISHINARI, K. a M. RINAUDO. Gelation of gellan – A review. *Food Hydrocolloids*. 2012, vol. 28, issue 2, s. 373–411. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.01.004

[34] LU, X., CHAN, C. Y., LEE, K., NG, NG, P. F., FEI, B., FU, J. Supe-tough and thermo-healable hydrogel – Promising for shape-memory absorbent fiber. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014, 21, s 7631–7638. DOI: 10.1039/c0xx00000x.

[35] FUJII, T., YANO, T., KUMAGAI, H. a O. MIYAWAKI. Scaling Analysis of the Concentration Dependence on Elasticity of Agarose Gel. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2000, vol. 64, issue 8, s. 1618-1622. DOI: 10.1271/bbb.64.1618.

[36] MATSUO, M., TANAKA, T. a L. MA. Gelation mechanism of agarose and κ-carrageenan solutions estimated in terms of concentration fluctuation. *Polymer*. 2002, vol. 43, issue 19, s. 5299–5309. DOI: 10.1016/S0032-3861(02)00290-2.

[37] HA, Y.C. a P. J. BARTER. Rapid separation of plasma lipoproteins by gel permeation chromatography on agarose gel Superose 6B. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1985, vol. 341, s. 154–159. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)84020-7.

[38] CHUNG, J. A., WOLLACK, J. W., HOVLID, M. L., OKESLI, A. CHEN, Y., MUELLER, J. D., DISTEFANO, M. D. a T. A. TATON. Purification of prenylated proteins by affinity chromatography on cyclodextrin-modified agarose. *Analytical Biochemistry*. 2009, vol. 386, issue 1, s. 1–8. DOI: 10.1016/j.ab.2008.09.007.

[39] PUÉRTOLAS, J. A., VADILLO, J. L., SÁNCHEZ-SALCEDO, S., NIETO, A., GÓMEZ-BARRENA, E. a M. VALLET-REGÍ. Compression behaviour of biphasic calcium phosphate and biphasic calcium phosphate–agarose scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*. 2011, vol. 7, issue 2, s. 841–847. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.07.032.

[40] BHAT, S. a A. KUMAR. Cell proliferation on three-dimensional chitosan–agarose–gelatin cryogel scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012, vol. 114, issue 6, s. 663–670. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.07.005.

[41] GAO, M., LU, P., BEDNARK, B., LYNAM, D., CONNER, J. M. a J. SAKAMOTO. Compression behaviour of biphasic calcium phosphate and biphasic calcium phosphate–agarose scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*. 2013, vol. 34, issue 5, s. 1529–1536. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.070.

[42] KIATKAMJORNWONG, S. Superabsorbent Polymers and Superabsorbent Polymer Composites. *Science Asia.* 2007, vol. 33, s. 39–43. DOI: 10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33(s1).039.

[43] FLORY, P. J. *Priciples of Polymer Chemistry*. 1953 Cornell University Press, Ithaca, NY, s. 576–590. ISBN 0-8014-0134-8.

[44] KUDELA, V. Hydrogels. In: H. F. Mark and J. I. Kroschwitz (Eds.). *Encyclopedia of Polymer Science Technology*. 1958, Vol 7., Wiley, New York, s. 783–807. DOI: 10.1002/pol.1989.140270108.

[45] KATSCHALSKY, A., LIFSON, S., EISENBERG, H. Equation of swelling for polyelectrolytes gels. *Journal of Polymer Scince.* 1951, vol. 7, s. 571–574. DOI: 10.1002/pol.1952.120080504.

[46] PEPPAS, N. A., KHARE, A.R. Preparation structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 1993. Vol. 11, s. 1–35. DOI: 0169-409X/93.

[47] BRANNON, M. L. Structural Characteristics and Swelling Behavior of pH-Sensitive Hydrogels. Ph.D. Thesis, School of Chemistry Engeneering, Purdue University, West Lafayette, IN.

[48] SIEGEL, R. A., FIRESTONE, B. A. pH-Dependent equilibrium swelling properties of hydrophobic polyelectrolyte copolymer gels. 1988. Macromolecules, vol. 21, pp. 3254–3259. DOI: 10.1021/ma00189a02.

[49] SALAMONE, J. C., RICE, W. C. Polyampholytes. In: H. F. Mark and J. I. Kroschwitz (Eds.), Encyclopedia of Polymer Science and Technology. 1985, vol. 11, Wiley, New York, 514–530. DOI: 10.3390/polym10101146

[50] ODIAN, G. Principles of polymerization. 1981, John Wiley and Sons, New York, pp. 179–318. ISBN 0-471-27400-3.

[51] PEPPAS, N. A., MIKOS, A. G. Preparation methods and structure of hydrogels. In: N. A. Peppas (Ed.), Hydrogels in Medicine and Pharmacy. 1987, vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-27.

[52] PHILLIPP, B. DAUTZENBERG, H., LINOW, K.-J., KOTZ, J., DAWYDOFF, W. Polyelectrolyte complexes – Recent developments and open problems. 1989. Prog. Polym. Sci. 14, 91–172. ISSN 0079-6700.

[53] WILSON, J. E. Radiation Chemistry of Monomers, Polymers and Plastics. 1974. Marcel Dekker, New York, pp. 253–319.

[54] SPERLING, L. H. Interpenetrating Polymer Network and Related Materials. 1981. Plenum press, New York.

[55] SUTRADHAR, S. C., KHAN, M. M. R., RAHM, M. M., DAFAR, N. C. The Synthesis of Superabsorbent Polymers from a Carboxymethylcellulose/acrylic Acid Blend Using Gamma Radiation and its Application in Agriculture. Journal of Physical Science, vol. 26(2), 2015, pp. 23–39.

[56] MACHÁČEK, T. *Rostlinné organely* [online]. 2005, [cit.2016-04-18]. Dostupné z: http://www.biomach.cz/biologie-rostlin/rostlinne-organy

[57] *Anatomie listu* [online]. 2008, [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/texty-organologie-anatomie.html

[58] *Plant – Anatomy, Growth and Function* [online]. 2016, [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: http://tpsbiology11student.wikispaces.com/Plants+-+Anatomy,+Growth,+and+Function.

[59] MACHÁČEK, T. *Rostlinná pletiva* [online]. 2005, [cit.2016-04-18]. Dostupné z: http://www.biomach.cz/biologie-rostlin/rostlinna-pletiva

[60] VOTRUBOVÁ, O. *Anatomie rostlin*. Praha: Karolinum, 2001. ISBN 80-246-0367-5.

[61] FERNÁNDEZ, V., SANCHO-KNAPIK, D., GUZMÁN, P., et. al. Wettability, polarity, and water absorption of holm oak leaves: effect of leaf side and age. Plant Physiology 2014, vol. 156, p. 168-180. DOI:10.1104/pp.114.242040.

[62] SERRANO, M., COLUCCIA, F., TORRES, M., L'HARIDON, F., MÉTRAUX, J. P. The cuticles and plant defense to pathogens. Frontiers in Plant Science. 2014, vol. 5, p. 274. DOI: 10.3389/fpls.2014.00274.

[63] KERSTIENGS, G. Cuticular water permeability and its physiological signifikance. Journal of Experimental Botany. 1996, vol. 47, p. 1813–1832. DOI:10.1093/JXB/47.12.1813.

[64] RIEDERER, M., SCHREIBER, L. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. Journal of Experimental Botany, 2001, vol. 52, p. 2023–2032. DOI: 10.1093/jexbot/52.363.2023.

[65] KRAUSS, P., MARKSTÄDTER, C., RIEDERER, M. Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. Plant Cell and Environment. 1997, vol. 20, p. 1079-1085. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1997.tb00684.x.

[66] EIGENBRODE, S. D., JETTER, R. Attachment to plant waxes by an insect predator. Integrative and Comparative Biology. 2002, vol 42, p. 1091–1099. DOI: 10.1093/icb/42.6.1091.

[67] JEFFREE, C. E. Structure and ontogeny of plant cuticles. In: Kerstiens G., ed. Plant cuticles: an integrated functional approach. Oxford: BIOS Scientific Publishers 1996, s. 33–82. DOI: 10.1002/9780470988718.ch2.

[68] RIEDERER, M. Introduction: Biology of the plant cuticle. In: Riderer M., Müller C., eds. Biology of the plant cuticle. Oxford: Blackwell Publishing, 1–10. ISBN: 978-1-405-13268-8.

[69] POLLAR, M., BEISSON, F., Li, Y., OHLROGGE, J.B., 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trend in Plant Science*, r. 13, s. 236-246. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.03.003.

[70] MOLINA, Isabel. Biosythesis of plant lipid polyesters. *Plant Lipid Biochemistry* [online]. 2010, [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/polyesters/index.htm

[71] GUZMAN, P., FERNÁNDEZ, V. GRACA, J., CABRAL, V., KAYALI, N., KHAYET, M., GIL, L. Chemical and structural analysis of *Eucalyptus globulus* and *E. camaldulensis* leaf cuticles: a lipidited cell wall region. Frontierś in Plant Science. 2014, vol. 5, p. 427. DOI: 10.3389/fpls.2014.00481.

[72] SEGADO, P., DOMINGUEZ, E., HEREDIA, A. Ultrastructure of the Epidermal Cell Wall and Cuticle of Tomato Fruit (*Solanum lycopersicum* L.) during Development. Plant Physiology. 2016, vol. 170, p. 935–946. DOI: 10.1104/pp.15.01725.

[73] BUSCHHAUS, C., JETTER, R. Composition differences between epicuticular and intacellular wax substructures: how do plants seal their epidermal surfaces? Journal of Experimental Botany. 2011, vol 62, p. 841–853. DOI: 10.1093/jxb/erq366.

[74] KOLATTUKUDY, P. E. Polyesters in higher plants. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2001, vol 71, p. 1–49. DOI: 10.1007/3-540-40021-4_1.

[75] FRANKE, R., et al. Suberin – a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. Curr. Opin. Plant Biol., 2007, vol. 10, p. 252–259. DOI: 10.1016/j.pbi.2007.04.004.

[76] GRACA, J. et al. Suberin: A biopolyester of plants‘ skin. Macromol. Biosci. 2007, vol. 7, p. 128–135. DOI: 10.1002/mabi.200600218.

[77] NAWRATH, C. Unraveling the complex network of cuticular structure and function. Curr. Opin. Plant Biol. 2006, vol. 9, p. 281–287. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.03.001.

[78] BERNARDS, M. A. Demystifying suberin. Can. J. Bot. 2002, vol. 80, p. 227–240. ISBN 978-81-322-2286-6.

[79] MATZKE, K. et al. A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L., and *Fagus sylvatica* L. Planta. 2001, vol. 185, p. 233–245. DOI: 10.1007/BF00194066.

[80] MARTINS, I., HARMATMANN, D. O., ALVES, P. C., MARTINS, C., GARCIA, H., LECLERCQ, C. C., FERREIRA, R., HE, J., RENAUT, J., BECKER, J. D., SILVA PEREIRA, C. Elucidating how the saprophytic fungus Aspergillus nidulans uses the plant polyester suberin as carbon source. BMC Genomics. 2014, vol. 15, p. 613. DOI: 10.1186/1471-2164-15-613.

[81] ENSTONE, D. E. et al. Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. J. Plant Growth Regul. 1003, vol. 21, p. 335–351. DOI:10.1007/s00344-003-0002-2.

[82] VILLENA, J. F. et al. Characterization and biosynthesis of non-degradable polymers in plant cuticles. Planta. 1999, vol 208, p. 181–187. DOI: 10.1007/s004250050548.

[83] KOLATTUKUDY, P. E. et al. Biosynthesis of the C18 family of cutin acids: ω-hydroxyoleic acid, ω-hydroxy-9,10-epoxystearic acid, 9,10,18-trihydroxy stearic acid, and their delta12-unsaturated analogs. Biochemistry. 1973, vol. 12, p. 4488–4498. DOI: 10.1021/bi00746a029.

[84] BUCHHOLZ, A. Characterization of the diffusion of non-electrolytes across plant cuticles: properties of the lipophilic pathway. J. Exp. Botany. 2006, vol. 57, i. 11, p. 2501–2513. DOI: 10.1093/jxb/erl023.

[85] FERNANDEZ, V. EICHERT, T. Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state pf knowledge and perspectives of foliar fertilization. Critical Reviews in Plant Sciences. 2009, vol 28, p. 36–68. DOI:10.1080/07352680902743069.

[86] EICHERT, T., FERNANDEZ, V. Uptake and release of mineral elements by leaves and other aerial plant parts. In: Marschner P., ed. Marschner's mineral nutrition of higher plants, 3rd edition, Academic Press, 2012, p. 77–84. ISBN: 978-01-2384-90-52.

[87] EICHERT, T., GOLDBACH, H. E., BURKHARDT, J. Evidence for the uptake of large anions through stomatal pores. Botanica Acta, 1998, vol. 111, p. 461–466. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1998.tb00733.x.

[88] EICHERT, T., BURKHARDT, J. Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model systém. Journal of Experimental Botany, 2001, vol 52, p. 771–781. DOI: 10.1093/jexbot/52.357.771.

[89] KANNAN, Seshadri. Mechanisms of foliar uptake of plant nutrients. *Journal of Plant Nutrition*. 1980, vol. 2, issue 6, s. 717-735. DOI: 10.1080/01904168009362810.

[90] HAAS, K., J. SCHÖNHERR, M. RIEDERER, Uta GEYER a J. SCHÖNHERR. Composition of soluble cuticular lipids and ater permeability of cuticular membanes from citrus leaves: Accomplishments and prospects. *Planta*. 1979, vol. 146, issue 4, s. 603-606. DOI: 10.1007/978-1-4684-1303-8_137.

[91] RIDERER, M., FRIEDMANN, A. In: Riederer M, Müller C., eds. Biology of the plant cuticle, Annual Plant Reviews. Oxford Blackwell, 2006, vol. 23, p. 250–279. ISBN: 978-1-405-13268-8.

[92] 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.

[93] 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.

[94] SCHÖNHERR, J. Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. Planta. 2000, vol. 212, p. 112–118. DOI: 10.1007/s004250000373.

[95] 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.

[96] TYREE, m. t., SCHERBATSKOY, T. D., TABOR, C. A. Leaf cuticles behave as asymmetric membranes: evidence from the measurement of diffusion potentials. Plant Physiology. 1990, vol. 92, p. 103–109. DOI: 10.1104/pp.92.1.103.

[97] SCHÖNHERR, J., HUBERT, R. Plant cuticles are polyelectrolytes with isoelectric points around thrre. Plant Physiology. 1977, vol 59, p. 145–150. DOI: 10.1104/pp.59.2.145.

[98] SCHÖNHERR, J., BUKOVAC, M. J. Penetration of stomata by liquids: dependence on surface tension, wettability, and stomatal morphology. Plant Physiology, 1972, vol. 49, p. 813–819. DOI: 10.1104/pp.49.5.813.

[99] CHAMEL, A. PINERI, M., ESCOUBES, M. Quantitative determination of water sorption by plant cuticles. Plant Cell and Environment. 1991, vol 14, p. 87–95. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1991.tb01374.x.

[100] CHAMEL, A., ESCOUBES, M., BAUDRAND, G., GIRARD, G. Determination of water sorption by cuticles isolated from fir tree needles. Trees. 1992, vol. 6, p. 109–114. DOI:10.1093/jxb/erx302.

[101] ARAND, K., STOCK, D., BURGHARDT, M., RIEDERER, M. pH-dependent permeation of amino acids through isolated ivy cuticles is affected by cuticular water sorption and hydration shell size of the solute. Journal of Experimental Botany. 2010, vol. 61, p. 3865–3873. DOI:10.1093/jxb/erq193.

[102] SCHÖNHERR, J. Cuticular penetration of calcium salts: effects of humidity, anions, and adjuvants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 2001, vol. 164, p. 225–231. DOI: 10.1002/1522-2624(200104)164:2<225::AID-JPLN225>3.0.CO;2-N.

[103] SCHÖNHERR, J., LUBER, M. Cuticular penetration of pottasium salts: effects of humidity, anions, and temperature. Plant and Soil. 2001, vol. 236, p. 117–122. DOI:10.1023/A:1011976727078.

[104] SCHÖNHERR, J. A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across astomatous cuticular membranes. Pest Management Science. 2002, vol 58, p. 343–351. DOI: 10.1002/ps.462.

[105] FIELD, R. J., BISHOP, N. G. Promotion of stomatal infiltration of glyphosate by an organo-silicone surfactant reduces the critical rainfall period. Pesticide Science. 1988, vol. 24, p. 55–62. DOI:10.1002/PS.2780240106.

[106] ZABKIEWICZ, J. A., STEVENS, P. J. G., FORSTER, W. A., STEELE, K. D. Foliar uptake of organosilicone surfactant oligomers into bean leaf in the presence and absence of glyphosate. Pesticide Science. 1993, vol. 38, p. 135–143. DOI: 10.1002/ps.2780380208.

[107] EICHERT, T., GOLBACH, H. E. Equivalent pore radius of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces – further evidence for a stomatal pathway. Physiologia Plantarum. 2008, vol. 134., p. 491–502. ISSN 2069-5837.

[108] BURKHARDT, J., BASI, S., PARIYAR, S., HUNSCHE, M. Stomatal penetration ny aqueous solutions-an update involving leaf surface particles. New Physiologist. 2012, vol. 196, p.774–787. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04307.x.

[109] EICHERT, T., KURTZ, A., STEINER, U., GOLDBACH, H. E. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. Physiologia Plantarum. 2008, vol. 12, p. 151–160. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2008.01135.x.

[110] BURGESS, S. S. O., DAWSON, T. E. The contribution of fog to the water relations of *Sequoia sempervirens* (D. Don) foliar uptake and prevention of dehydration. Plant Cell and Environment. 2004, vol 24, p. 1023–1034. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2004.01207.x.

[111] WESTHOFF, M., ZIMMERMANN, D., ZIMMERMANN, G., GESSNER, P., WEGNER, L. H., BENTRUP, F.W., ZIMMERMANN, U. Distribution and function of epistomatal mucilage plugs. Protoplasma. 2009, vol 235, p. 101–105. DOI:10.1007/s00709-008-0029-0.

[112] BASI, S., BURKHARDT, J., NOGA, G., HUNSCHE, M. Hygroscopic salts support the stomatal penetration of glyphosate and influence its biological efficacy. Weed Biology and Management. 2014, vol. 14, p. 186–197. DOI: 10.1111/wbm.12046.

[113] FERNANDEZ, V., SANCHO-KNAPIK, D., GUZMAN, P. et al. Wettability . polarity, and water absorption of holm oak leaves:effect of leaf side and age. Plant Physiology. 2014, vol. 166, p. 168–180. DOI: 10.1104/pp.114.242040.

[114] PROJEKT. *Nové metody a postupy při sklizni a zpracování obilovin*. 10/010/1310b/110002595. Evropský zemědělský fond pro rozvoj venkova: Evropa investuje do venkovských oblastí.

[115] REUVENI, R. a M. REUVENI. Foliar-fertilizer therapy — a concept in integrated pest management. *Crop Protection*. 1998, vol. 17, issue 2, s. 111-118. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/s0261-2194(97)00108-7.

[116] KIRKWOOD, R.C. Recent developments in our understanding of the plant chicle as a barrier of the foliar uptake of pesticides. *Pesticide Science*, vol. 55, issue 1, s. 69, 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9063(199901)55:1<69::AID-PS860>3.0.CO;2-H.

[117] ELDER, K. and B. DÁLE. *In-vitro fertilization.* New York: Cambridge University Press. 2011. ISBN 9780521730723.

[118] Výroba a využití organických hnojiv – organické látky. Mendelova univerzita v Brně [online]. 20-04-2016 [cit. 2016-04-20]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty 2/vseo/stranka.php?kod=470

[119] COMTE, I., COLIN, F., GRÜNBERGER, O., FOLLAIN, S., WHALEN, JK a JP, CALIMAN. Landscape-scale assessment of soil response to long-term organic and mineral fertilizer application in an industrial oil palm plantation, Indonesia. *Agriculture, ecosystems.* 2013, r. 169, č. 13., s. 58 – 68. DOI: 10.1016/j.agee.2013.02.010

[120] HYTÖNEN, Jyrki. Effect of peat ash fertilization on the nutrient status and biomass production of short rotation willow on cut-away peatland area. *Biomass and Bioenergy*. 1998, r. 15, č. 1, s. 83-92. DOI: 10.1016/S0961-9534(97)10050-2.

[121] Hnojiva minerální. Mendelova univerzita v Brně [online] 20-04-2016 [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/index.pl?cast=71353

[122] NEUMANN, Peter M. a M. REUVENI. Rapid Evaluation of Foliar Fertilizer-induced Damage: N, P, K, S on Corn1. *Agronomy Journal*. 1979, vol. 71, issue 4, s. 598-. DOI: 10.2134/agronj1979.00021962007100040019x.

[123] LI, D a X. WANG. Nitrogen isotopic signature of soil-released nitric oxide (NO) after fertilizer application. *Atmospheric Environment*. 2008, r. 42, č. 19, s. 4747–4754. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2008.01.042.

[124] MCCLANAHAN, T. R., CARREIRO-SILVA, M. a M. DILORENZO. Effect of nitrogen, phosphorous and their interaction on coral reef alga successioon in Glover's Reef, Belize. *Marine Pollution Bulletin.* 2007, r. 54, č. 12, s. 1947–1957. DOI: 10.1016/j.marpolbul. 2007.09.023.

[125] SANTOS, J. I., DA SILVA, T. B., ROGÉRIO, F., SANTROS, R. F. a D. SECCO. Yield response in crambe to potassium fertilizer. *Industrial Crops and Products.* 2013, r. 43, č. 6, s. 297–300. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.07.043.

[126] LIU, C. H., WU, J. Y. a J. S. CHANG. Diffusion characteristics and controlled release of bacterial fertilizers from modified calcium alginate capsules- *Bioresource Technology*. 2008, r. 99, č. 6, s. 1904-1910. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.03.029.

[127] AMAGRO HUMIC SUBSTANCES. AG TOP TIP 2008 [online] 12.6.2016 [cit. 2016-06-12]. Dostupné z: https://www.amagro.com/

[128] MASARO, L, X.X ZHU, W. BORCHARD, A. STRAATMANN, Mohammad KARIMI, W. PHILIPPOFF, X. X. ZHU, L. MASARO, J.-M. PETIT, B. ROUX a P. M. MACDONALD. Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids: The Use of a New Physical Model of Diffusion. *Progress in Polymer Science*. 1999, vol. 24, issue 5, s. 223-241. DOI: 10.1093/jxb/erl023.

[129] CUSSLER, E. *Diffusion: mass transfer in fluid systems*. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2009, xvii, 631 p. ISBN 978-0-521-87121-1.

[130] CRANK, J. *The mathematics of diffusion.* 2nd Ed. Oxford: Oxford University Press, c1975, viii, 414 p. ISBN 05-215-6477-8.

[131] ATKINS, Peter William. *Atkins' Physical Chemistry: mass transfer in fluid systems*. 7th ed. Oxford: Oxford University Press, 2002, xvii, 631 p. ISBN 01-987-9285-9.

[132] KALINA, Michal. *Využití průtokové coulometrie ve studiu transportu kovových iontů v humininových gelech*. Brno, 2010. Diplomová práce. Vysoké učení technické, Fakulta chemická. s. 69. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.d.

[133] DOJČANSKÝ, Ján a LONGAUER. *Chemické inžinierstvo II: difúzne procesy, prestup látky, absorpcia, adsorpcia, destilácia a rektifikácia, extrakcia, úprava vzduchu a chladenie vody, sušenie, kryštalizácia, membránové procesy*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2000, 392 s. ISBN 80-967-0648-9.

[134] SMILEK, J.: *Nové metody studia reaktivity a transportních vlastností biopolymerů*. Brno, 2015. 166 s., 65 s. příloh. Dizertační práce na Chemické fakultě Vysokého učení technického v Brně na Ústavu Fyzikální chemie. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

[135] 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.

[136] 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.

[137] DARLINGTON, W. A., CIRULIS, N. Permeability of Apricot Leaf Cuticle. Plant Physiology. 1962, p. 462–467. DOI: 10.1104/pp.38.4.462.

[138] 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.

[139] 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.

[140] WANG, CJ and ZQ, LIU. Foliar uptake of pesticides – Present status and fature challenge. *Pesticide Biochem. And Physiol*., 2007, vol. 87, pp. 1-8. DOI: 10.1016/j.pestbp.2006.04.004.

[141] 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.

[142] 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.

[143] BAUER, H. a J. SCHÖNHERR. Determination of mobility of organic compounds in plant cutciles and correlation with molecular volumes. *Pestic. Sci*. 1992, r. 35, s. 1-11. DOI: 10.1002/ps.2780350102.

[144] 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.

[145] 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.

[146] 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.

[147] 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.

[148] SOLEL, Z, Lloyd EDGINGTON. Transcuticular Movement of Fungicides. *Phytopathology*. 1972, vol. 63, issue 4. DOI: 10.1094/phyto-63-505.

[149] 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.

[150] 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.

[151] HINSVARK, O. N., WITTWER, S. H. a H. B., TUKEY. The metabolism of foliar-applied urea. I. Relative rates of $C^{14}O_2$ production by certain vegetable plants teated with labelled urea. *Plant Physiol*. 1953, r. 28, s. 70-76. DOI: 10.1104/pp.28.1.70.

[152] YAMADA, Y., WITTWER, SH, BUKOVAC, MJ. Penetration of Organic Compounds Through Isolated Cuticular Membranes with Special Reference to C^{14} Urea. *Plant Physiol.* 1964, vol. 40, issue 1, pp. 170-175. DOI: 10.1104/pp.40.1.170.

[153] CHAMEL, A and N., VITTON. Sorption diffusion of ^{14}C-atrazine through isolated plant cuticles. *Chemosphere*, 1996, vol. 33, issue 6, pp. 995-1003. DOI: 10.1016/0045-6535(96)00241-X.

[154] 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.

[155] 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.

[156] 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.

[157] 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.

[158] 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. DOI:10.1093/JXB/ERJ217.

[159] VILLENA, J. F., DOMINGUEZ, E., HEREDIA, A. Monitoring Biopolymers Present in Plant Cuticles by FT-IR Spectroscopy. Journal of Plant Physiology. 2000, vol. 156, p. 419–422. DOI: 10.3389/fpls.2014.00305.

[160] RAMIREZ, F. J., LUQUE, A. HEREDIA., RIEDERER, M., BUKOVAC, J. Fourier transform IR study of enzymatically isolated tomato fruit cuticular membrane. Biopolymers. 1992, vol 32, p. 1425–1429. DOI: 10.1002/bip.360321102.

[161] LUQUE, P., HEREDIA, A., RAMIREZ, F. J., BUKOVAC, J. Naturforsch. 1993, vol. 48 c, p. 666–669. DOI: 10.3389/fpls.2014.00305.

[162] HOLLOWAY, P. J. The Plant Cuticle. In: Cutler, D. F., K. L. Alvin and C. E. Price (eds.): Chap. 1, p. 1 – 42. Academic Press, London. 1982. DOI: 10.1111/j.1095-8339.1998.tb02529.x.

[163] LUQUE, P., RAMIREZ, P. J., HEREDIA, A., BUKOVAC, M. J. Air Pollutants and the Leaf Cuticle. In: Percy, K. E., J. N. Cape, R. Jagels and C. J. Simpson (eds.): NATO ASI Series, vol. G 36, p. 217–223. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1994).

[164] FENGEL, D. Chemical, Biochemical, and Material Sciences. In: Kennedy, J. F., G. O., Philips and P.A. Williams (eds.): p. 135–140. Ellis Horword, London. 1993. DOI:10.1007/s004250050548.

[165] RORRER, G. L., HAWLEY, M. C., SELKE S. M. LAMPORT, D. T. A., DEY, P. M. Methods in Plant Biochemistry. Carbohydrates. 1990, vol. 2, p. 581–606. ISBN 0 12 461012 9.

[166] 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.

[167] 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.

[168] 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.

[169] 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.

[170] CONSIDINE, J. A., KNOX, R. B. Development and histochemistry of the cells, cell walls and cuticle of the dermal systém of fruit of the grape, *Vitis vinifera* L. Protoplasma. 1979, vol. 99, p. 347–365. DOI: 10.1007/BF01275807.

[171] 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.

[172] 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.

[173] PARTAP, S. A., MUTHUTANTRI, I. U., REHMAN, G. R. D. a J. A. DARR. Preparation and characterisation of controlled porosity alginate hydrogels made via a simultaneous micelle templating and internal gelation process. *Journal of Materials Science*. 2007, r. 42, č. 10, s. 3502-3507. DOI: 10.1007/s10853-007-1533-x.

[174] CASCONE, M. G., LAZZERI, L., SPARVOLI, E., SCATENA, M., SERINO, L. P., DANTI, S., ZHU, J., HU, J. a R.E. MARCHANT. Morphological evaluation of bioartificial hydrogels as potential tissue engineering scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2004, r. 15, č. 12, s. 238–275. DOI: 10.1533/9780857098887.2.238.

[175] LAŠTŮVKOVÁ, M. Návrh a optimalizace metody studia penetrace huminových kyselin do listů. 2012. Bakalářská práce. Vedoucí práce: Ing. Petr Sedláček, Ph.D. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, s. 52.

[176] LAŠTŮVKOVÁ, M. Studium transportu huminových látek skz roslinné kutikuly. 2014. Diplomová práce. Vedoucí práce: Ing. Petr Sedláček, Ph. D. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, s. 100.

[177] RAYMENT, G. E., LYONS, D. J. Soil Chemical Methods – Asutralasia. Australian Soil and Land Survey Handbookks Series. CSIRO Publishing, 2010. ISBN 9780643101364.

[178] YAN, Dan, Cheng JIN, Xiao-He XIAO, Xiao-Ping DONG a Joerg SCHOENHERR. Antimicrobial properties of berberines alkaloids in Coptis chinensis Franch by microcalorimetry. J. Biochem. Biophys. Methods. 2008, 70(6), 845-849 DOI: 10.1016/j.jbbm.2007.07.009.

[179] ROTARU, A., NICOLAESCU, I., ROTARU, P., NEAGA, C. Thermal characterization of humic acids and other components of raw coal. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2008, vol. 92, i. 1, p. 297-300. DOI:10.1007/s10973-007-8816-y.

[180] JU, Z., BRAMLAGE, W. J.Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. Phostharvest Biology and Technology. 1999, 16, s. 107–118. DOI: 10.21273/HORTSCI.34.3.508B.

[181] JU, Z., BRALAGE, W. J. Cuticular phenolics and scald development in ‚Delicious' apples. Journal of the American Society for Horticultural Science. 2000, 125, s. 498–504. DOI: 10.21273/jashs.125.4.498.

[182] ESPANA, L. HAREDIA-GUERRERO, J. A., SEGADO, P., BENITEZ, J. J., HEREDIA, A., DOMIGUEZ, Z. Biomechanical properties of the tomato (*Solanum lycopersicumi*) fruit cuticle during development are modulated bz changes in the relative amounts of its components. New Phztologist. 2014, 202, s. 790–802. DOI: 10.1111/nph.12727.

[183] SMILEK, J. Studium reaktivity biopolymerů v gelové fázi. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 94 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

[184] SEDLÁČEK, P. Multiscale study on the structure – transport – flow relationship in the behavior of biopolymer-based hydrogels. Ministerstvo Školství, Mládeže a Tělovýchovy (Prague). Grant Number COST LD 15047, 2015–2017.

[185] Vyhláška Ministerstva zemědělství o stanovení požadavků na hnojiva. Vyhláška č. 474/2000 Sb. [5.6.2018]. http://www.epi.sk/zzcr/2000-474

[186] 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.

[187] LUQUE, P., BRUQUE, S., HEREDIA, A. Water permeability of isolated cuticular membranes: a structural analysis. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1995, 317, s. 417–422. DOI: 10.1006/abbi.1995.1183.

[188] 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-kysela-neutralni-ci-zasadita/

[189] 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.

[190] 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.

[191] 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/

[192] GILLIAM, P. PMG Biology - Biology posts related to EdExcel IGCSE spesification. 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/.

[193] NEUBERG, J. Hnojení a výživa rostlin na zahradě. Praha: Grada, 1998, s. 152. ISBN 80-7169-496-7.

[194] MALÝ, I. Polní zelinářství. Praha: Agrospoj, 1998, s. 196. ISBN 80-239-4232-8.

[195] PROCHÁZKA, S. a MACHÁČKOVÁ, I. Fyziologie rostlin. Praha: Academia, 1998, s. 484, ISBN 80-200-0586-2.

[196] TORMA, S. Dusík. Nenahraditelný prvek v půdě a rostlině. *AGRO*, 2005, 10(1), 27–29.

[197] VANĚK, V. Výživa a hnojení – polních a zahradních plodin. Praha: Martin Sedláček, 2002, s. 132. ISBN 80-902413-7-9.

[198] ENSLEY, S. a BARNHART, S.K. Nitrate toxicity. Iowa Beef Center, Iowa State University. 2012, 50, s. 3.

[199] Sbírka zákonů. Česká republika. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 53. Ročník 22, 2002, s. 866–984.

[200] STUPKOVÁ, V. Kvantifikace zásoby dusíku v půdě v závislosti na typu lesa. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, katedra Biologie ekosystémů. Vedoucí práce: doc. Ing. Emil Cienciala, Ph.D. 2009, s. 36.

[201] ŠIMEK, M. Základy nauky o půdě, 3. Biologické procesy a cykly prvků. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice. 2003, p. 98.

[202] Úroda – článek v časopise. BOUMA, D. Oxid uhličitý rostlinám prospívá. [online] 12.2.2010 [12.2.2010]. Dosupné z: https://www.uroda.cz/oxid-uhlicity-rostlinam-prospiva/

[203] HYVÖNEN, R., PERSSON, T., ANDERSSON, S., OLSSON, B., AGREN, G.I., LINDER, S. Impact of Long-Term Nitrogen Addition on Carbon Stocks in Trees and Soils in Northern Europe. *Biogeochemistry*. 2008, 89(1), p. 121–137. DOI:10.1007/s10533-007-9121-3.

12 SEZNAM ZKRATEK

Celý název objektu	zkratka
B	
bakalářská práce	BP
C	
cetyl trimethylammonium bromid	CTAB
chemicky izolované kutikuly	CHIK
E	
enzymaticky izolované kutikuly	EIK
ethylendiamintetraacetát	EDTA
extrahované kutikulární vosky	MX
F	
Fakulta chemická, Vysokého učení technického	FCH, VUT
fulvinové kyseliny	FK
H	
huminové látky	HL
huminové kyseliny	HK
huminy	HU
hymatomelanová kyselina	HMK
I	
infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací	FT-IR
interpenetrační polymerní síť (angl. *interpenetrating polymer network*)	IPN
izotermická kalorimetrie (angl. *isothermal calorimetry*)	ITC
K	
kutikulární membrána (angl. *Cuticular membrane*)	CM
L	
lignohumát draselný	LH
M	
mezinárodní společnost huminových látek (angl. *International Humic Substances Society*)	IHSS
mikroskopie doby života fluorescence (angl. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*)	FLIM
N	
N-(1-naphtyl-ethylenediamine dihydrochloride)	NED
O	
P	

peridermová buňka (angl. p*eriderm cell*)	PC
plynová chromatografie	GC
polyhydroxyethykmethakrylát	PHEMA
polykarbonát	PK
polymethylmethakrylát	PMMA
polyvinyl alkohol	PVA
princip syntézy hydrogelů (angl. *micelle templating*)	MT
půdní organická hmota (angl. *soil organic matter*)	SOM

R

rastrovací elektronová mikroskopie (angl. *scanning electron microscopy)*	SEM
relativní vlhkost (angl. *relative humidity*)	RH
reologie (angl. *Rheometer*)	REO
rozpustná relativní hmotnost (angl. *Deliquescence relative humidity*)	DRH
rtuťové porozimetrie (angl. *mercury intrusion porozimetry*)	MIP

S

skenovací konfokální laserová mikroskopie (angl. *confocal laser scanning microscopy*)	CLSM
superabsorbenty (angl. *superabsorbent polymers*)	SAPs

T

termogravimetrická analýza (angl. *thermogravimetric analysis*)	TGA

V

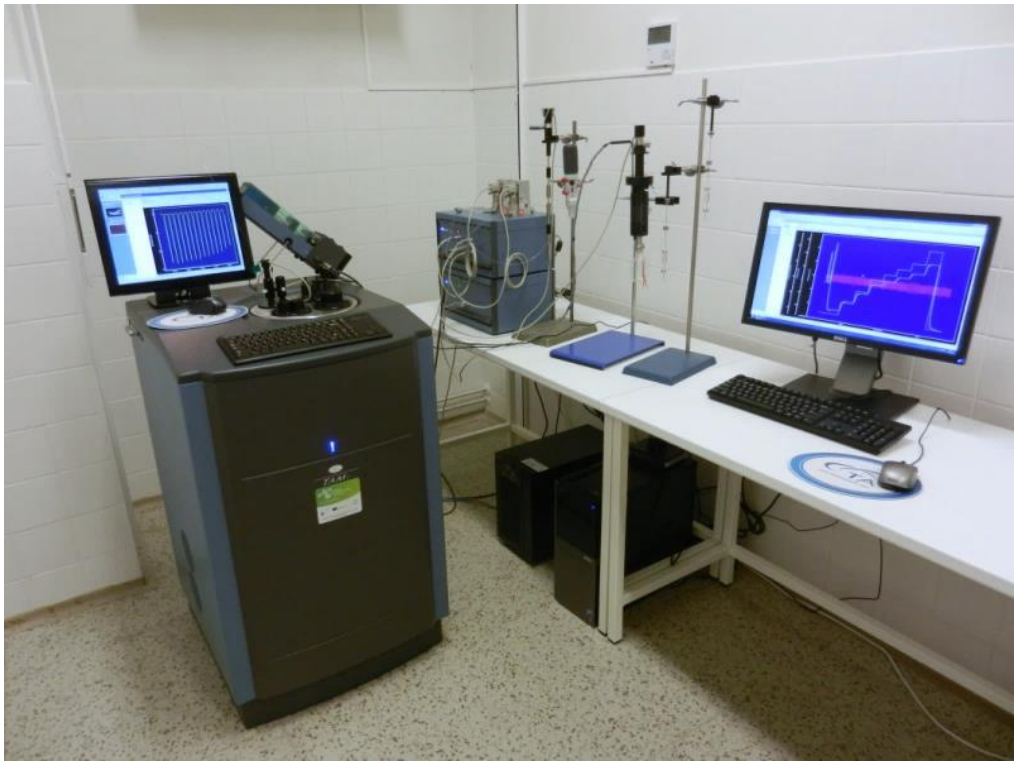
velmi dlouhé řetězce mastných kyselin (angl. *very-long-chain fatty acids*)	VLCFA

13 PŘÍLOHY

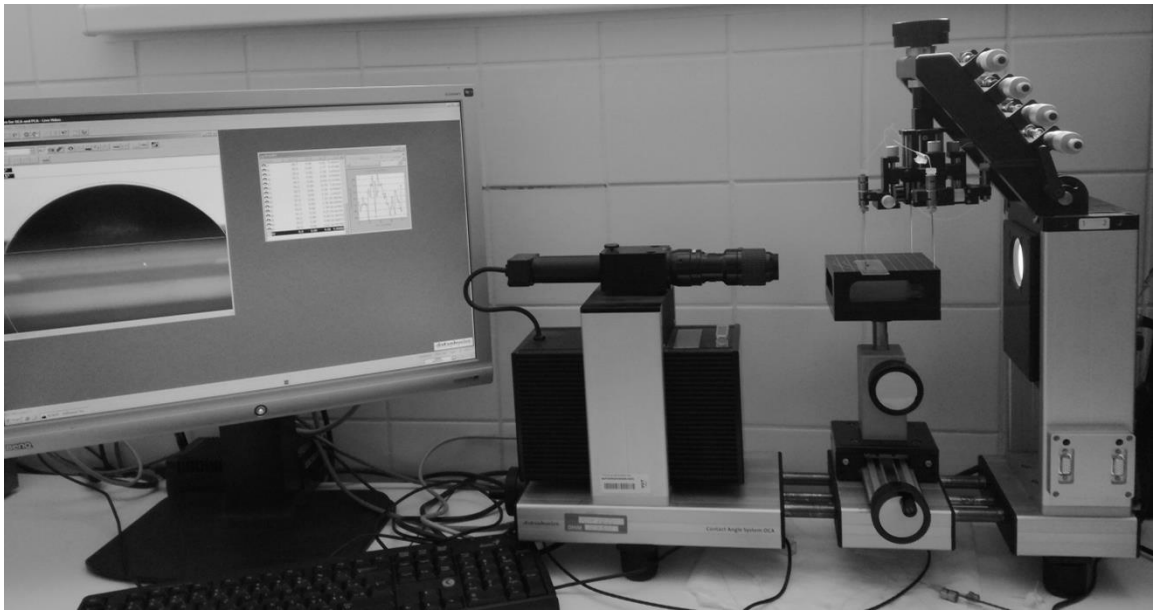
Příloha 1 Optický mikroskop Olympus IX71 ve spojení s emisní lampou X-Cite Series 120 Q a fluorescenční korelační mikroskopií respektive mikroskopie doby života fluorescence MicroTime 200 od PicoQuant.

Příloha 2 Optický mikroskop Nikon Eclips C*i*. Pro rozřazování vzorků kutikul na abaxiální a adaxiální stranu.

Příloha 3 Modulační mikrokalorimetr s izotermální mikrokalorimetrií a izotermální titrační kalorimetrií.

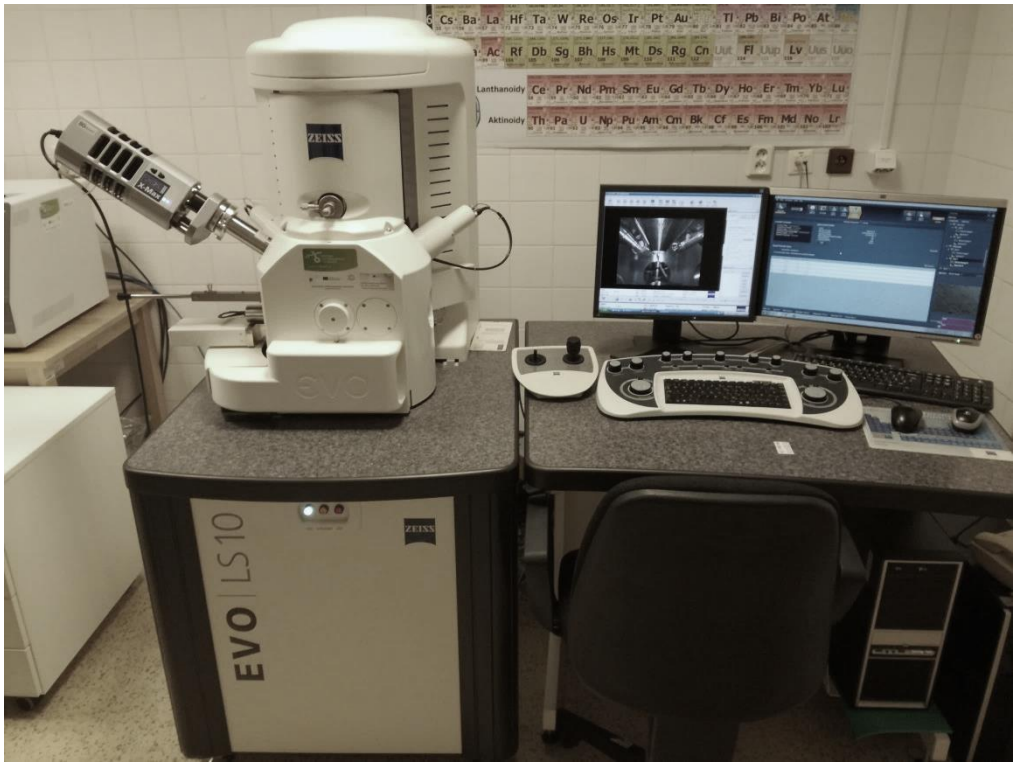


Příloha 4 Přístroj na měření kontaktního úhlu smáčivosti povrchu materiálu. Contact Angle Systém OCA od společnosti DataPhysics.



Příloha 5 Rtuťová porozimetrie (angl. Mercury Intrusion Porosimetry) model PoroMaster 60 od společnosti Quantachrome.

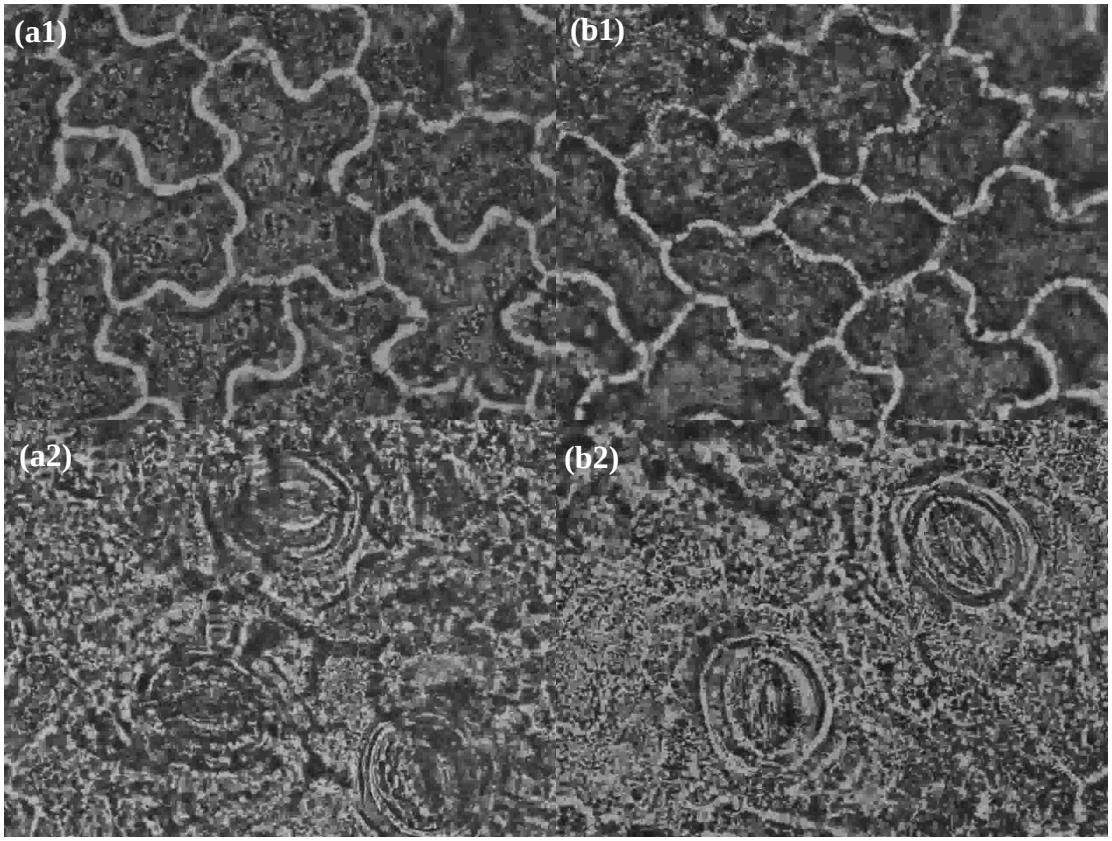
Příloha 6 Rastrovací elektronový mikroskop ZEISS EVO LS 10.



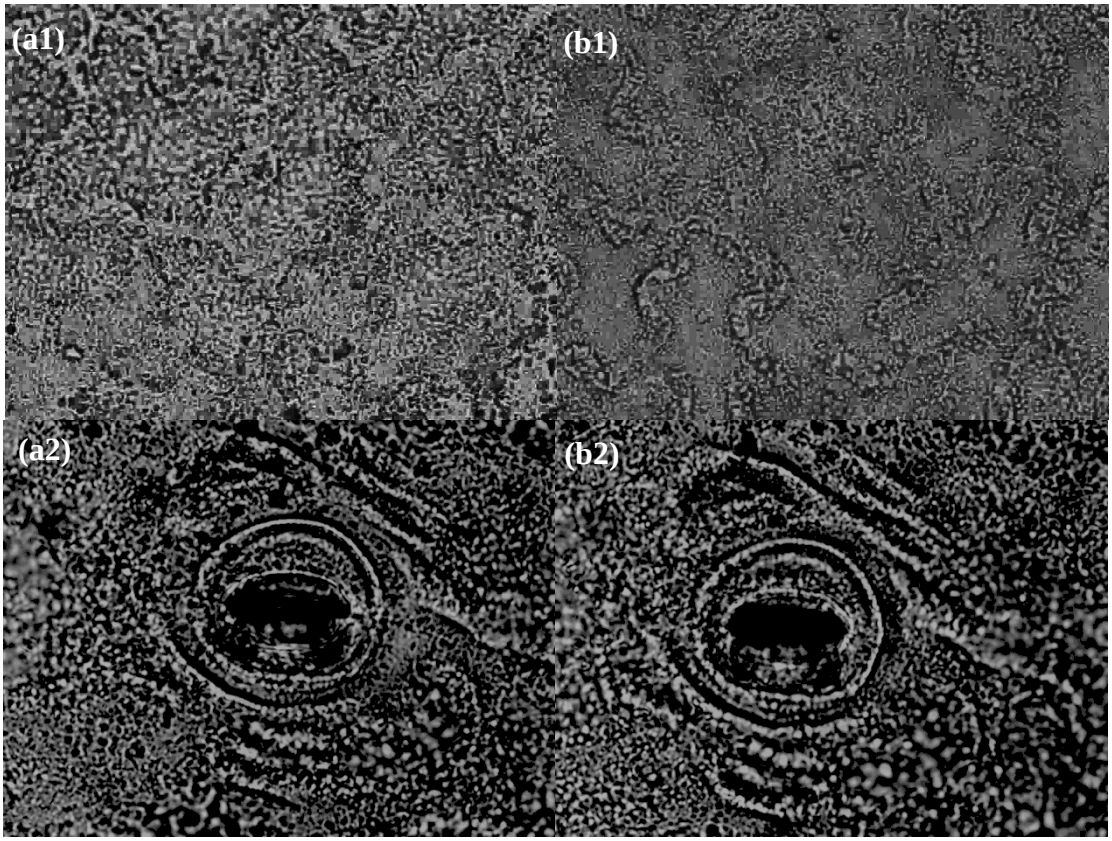
Příloha 7 Reometr AR G2 od TA Instruments Inc.

Příloha 8 UV-VIS spektrometr Varian Cary 50 pro měření difúzních experimentů (vlevo). Posuvný stojan pro měření jednotlivých spekter v kyvetě po kroku 1 respektive 2 mm (vpravo).

Příloha 9 Optická mikroskopie povrchů kutikul ze strany izolace mezofylu (a) a ze strany bez odstraňování mezofylu (b). Snímky pro chemicky izolované kutikuly – horní (1) a spodní (2).



Příloha 10 Optická mikroskopie povrchů kutikul ze strany izolace mezofylu (a) a ze strany bez odstraňování mezofylu (b). Snímky pro enzymaticky izolované kutikuly – horní (1) a spodní (2).



14 VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST

14.1 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.

14.2 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 editation 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.

14.3 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 Barries for the Uptake of Fertilizers. Czech Chemical Society Symposium Series, 2015, roč. 13, č. 2, s. 93-96. ISSN: 2336- 7210.

14.4 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 dilomových 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.

14.5 ABSOLVOVANÉ STÁŽE

03 – 05/2018 studentská stáž na Johannes Kepler Universität in Linz, prof. Milan Kracalik ERASMUS

11/2017 studentská stáž na Johannes Kepler Universität in Linz, prof. Milan Kracalik AKTION projekt

08–10/2017 studentská stáž na Monash University, Melbourne, Australia, prof. Antion Patti TRAVEL AWARDS IHSS studentský grant

5/2017 studentská stáž na Johannes Kepler Universität in Linz, prof. Milan Kracalik AKTION projekt

6/2016 studentská stáž na Johannes Kepler Universität in Linz, prof. Milan Kracalik AKTION projekt

3/2016 studentská stáž na Johannes Kepler Universität in Linz, prof. Milan Kracalik MOBILITY

12/2015 studentská stáž na Johannes Kepler Universität in Linz, prof. Milan Kracalik AKTION projekt

14.6 ABSOLVOVANÉ ZAHRANIČNÍ KONFERENCE

9/2017 9th International Conferece of Nanomaterials – Research and Application, Brno, Czech Republic

Forma účasti: poster

9/2016 8th International Conferece of Nanomaterials – Research and Application, Brno, Czech Republic

Forma účasti: poster

9/2016 18th International Conference of International Humic Substances Society, Kanazawa, Japan

Forma účasti: prezentace a poster

6/2016 XVI. Workshop of physical chemists and electrochemists, Brno, Czech Republic

Forma účasti: poster

12/2015 Chemie je život, Brno, Czech Republic

Forma účasti: prezentace

10/2015 7th International Conferece of Nanomaterials – Research and Application, Brno, Czech Republic

Forma účasti: poster

9/2015 6th meeting on Chemistry & Life, Brno, Czech Republic,

Forma účasti: poster

4/2015 CEITEC Ph.D. Retreat, Valtice, Brno, Czech Republic

Forma účasti: poster

11/2014 6th International Conferece of Nanomaterials – Research & Application, Brno, Czech Republic

Forma účasti: poster

10/2014 CEITEC Annual Conferece: Frontiers in Material and Life Sciences, Brno, Czech Republic

Forma účasti: poster

14.7 OSTATNÍ ZAHRANIČNÍ AKTIVITY

5/2015 EXPO 2015, Milan, Italy

Forma účasti: reprezentace FCH VUT v Brně představením *Molekulární strava a kouzelná kuchyně*

15 PLNÉ VERZE IMPAKTOVANÝCH ČASOPISŮ

Článek č. 1

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.

Článek č. 2

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.

Článek č. 3

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.

Článek č. 4

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.

Článek č. 5

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.