



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

VYUŽITÍ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH METOD PRO STUDIUM INTERAKCE HUMINOVÝCH LÁTEK S ROSTLINNÝMI KUTIKULAMI

USAGE OF PHYSICAL-CHEMICAL METHODS FOR THE STUDY
OF INTERACTION OF HUMIC SUBSTANCES WITH THE PLANT CUTICLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Eliška Rampáčková

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. Marcela Laštůvková

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1174/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Eliška Rampáčková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Marcela Laštůvková**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Využití fyzikálně-chemických metod pro studium interakce huminových látek s rostlinnými kutikulami

Zadání bakalářské práce:

- 1) Zpracovat literární rešerši zaměřenou na vaznost sloučenin na rostlinné kutikuly a kvantitativní stanovení množství sorbované látky.
- 2) Využití fyzikálně-chemických metod pro studium vaznosti respektive interakce huminových látek s rostlinnými kutikulami.
- 4) Zhodnocení dosažených výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19. 5. 2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Eliška Rampáčková
student(ka)

Ing. Marcela Laštůvková
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

V Brně dne 31.1.2017

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá studiem interakce (respektive vaznosti či adsorpce) rostlinných kutikul s lignohumátem draselným, coby kapalným zemědělským přípravkem využívaným v oblasti foliárního hnojení, které patří k nejpoužívanějším agronomickým aplikacím vůbec. Studovanými materiály se stala rostlinná kutikula, která tvoří nejsvrchnější část rostliny a lignohumát draselný (komerčně Lignohumát) hojně využívaného díky svým vlastnostem umožňujícím zvyšovat kvalitu, růst a výnosnost plodin.

Náplní předložené bakalářské práce bylo zpracovat rešerši na téma vaznosti sloučenin na rostlinné kutikuly, využitelné metody pro tuto oblast výzkumu a využití termických metod (přesně isotermální mikrokalorimetrie a termogravimetrie). Dalším krokem bylo využití této instrumentace, coby fyzikálně-chemických metod pro posouzení schopnosti vaznosti Lignohumátu na rostlinné kutikuly.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with the study of interaction (or binding or adsorption) of plant cuticle with potassium lignohumate, as a liquid agriculture product used in the field of foliar fertilization, which belongs to the most used agronomic applications in general. The studied materials became the plant cuticle, which forms upper part of plants and potassium lignohumate (commercially Lignohumate), which is widely used thanks to its properties, which allow to increase the quality, growth and profitability of the crops.

The aim of this bachelor's thesis was to investigate the binding of compounds to plant cuticles, useful methods for this field of research and the use of thermal methods (precisely isothermal microcalorimetry and thermogravimetry). The next step was to use this instrumentation as a physicochemical method for assessing the ability of Lignohumate to bind to plant cuticles.

KLÍČOVÁ SLOVA

humínové látky; rostlinné kutikuly; foliární hnojení; mikrokalorimetrie

KEYWORDS

Humic substances; cuticles; foliar fertilization; microcalorimetry

CITACE

RAMPÁČKOVÁ, E. *Využití fyzikálně-chemických metod pro studium interakce huminových látek s rostlinnými kutikulami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 58 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Marcela Laštůvková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že bakalářská práce byla vypracována samostatně a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Chemické fakulty VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis autora

DECLARATION

I declare that the bachelor's thesis has been worked out by myself and that all the quotations from the used literary sources are accurate and complete. The content of the bachelor's thesis is the property of the Faculty of Chemistry of Brno University of Technology and all commercial uses are allowed only if approved by both the supervisor and the dean of the Faculty of Chemistry, VUT.

.....

podpis autora

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala Ing. Marcele Laštůvkové za čas, odborné rady a vedení při zpracování bakalářské práce. Zároveň děkuji Ing. Jitce Krouské, Ph.D. a Leoně Kubíkové za ochotu a pomoc při zpracování vzorků pro měření.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Cíle práce.....	8
3	Teoretická část.....	9
3.1	Huminové látky	9
3.1.1	Původ, výskyt a vlastnosti huminových látek.....	9
3.1.2	Teorie vzniku huminových látek	10
3.1.3	Dělení a struktura huminových látek	10
3.1.4	Průzkum a stanovení struktury huminových látek.....	12
3.1.5	Použití huminových látek v praxi	13
3.2	Biologie listu.....	14
3.2.1	Stavba listu.....	14
3.2.2	Listová kutikula	15
3.2.3	Mikromorfologie listové kutikuly.....	17
3.3	Foliární hnojení a funkce rostlinných kutikul	18
3.3.1	Faktory ovlivňující příjem živin	19
3.4	Využití fyzikálně-chemické metody	19
3.4.1	Modulární titrační mikrokolorimetrie	20
3.4.2	Termogravimetrická analýza	20
4	Současný stav řešené problematiky	22
4.1	Plynová chromatografie v modifikaci headspace	22
4.2	Kapalinová scintilační spektrometrie	23
4.3	Ultrafialová spektrofotometrie.....	23
4.4	Mikrokolorimetrie.....	24
4.4.1	Zkoumání účinků alkaloidů na bakterii Escherichia coli.....	24
4.4.2	Zkoumání účinků hnojení na mikrobiální aktivitu v půdě.....	25
5	Experimentální část	27
5.1	Použité chemikálie.....	27
5.2	Použitá instrumentace a další zařízení	27
5.3	Separace rostlinných kutikul z listů	27
5.3.1	Enzymatická metoda separace kutikul	28

5.3.2	Chemická metoda separace kutikul	29
5.4	Příprava vzorků kutikul pro optickou mikroskopii.....	30
5.5	Příprava vzorků pro isothermní mikrokalorimetrii	31
5.6	Příprava vzorků pro termogravimetrickou analýzu	31
6	Výsledky a diskuze.....	33
6.1	Charakterizace rostlinných kutikul optickým mikroskopem	33
6.2	Souhrn měření sorpce pomocí mikrokalorimetrie	35
6.3	Souhrn měření sorpce pomocí termogravimetrické analýzy	39
7	Závěr.....	44
8	Použitá literatura.....	45
9	Seznam symbolů a zkratk	48
10	Příloha.....	49
10.1	Grafy měření mikrokalorimetrie.....	49
10.2	Grafy termogravimetrické analýzy	54

1 ÚVOD

Hnojení rostlin má dlouho velký význam v oblasti zemědělské sféry. Účinků hnojiv se využívá ke zvýšení růstu rostlin a zvýšení jejich výnosnosti. Foliární hnojivo, sorbované nebo obecně vázané na listy, a vykazuje významně vyšší účinek pro rostlinu, než hnojivo aplikované do kořenového systému. Naším záměrem bylo prostudovat schopnost rostlinných kutikul, materiálů tvořících povrch rostlin zodpovědných za respiraci, regulaci vody a transport látek, interagovat s aplikovanou látkou.

Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na problematiku huminových látek, jejich historii, vlastnosti a účinky na organický materiál. Zároveň stručně popisuje stavbu listu, jeho jednotlivé vrstvy, avšak převážně se zaměřuje na kutikuly. Značná pozornost je věnována také foliárnímu hnojení a procesům sorpce huminových látek na rostlinnou kutikulu.

Simulace foliárního hnojení jsou zpravidla prováděny na izolovaných rostlinných kutikulách. Listové kutikuly mohou být získány různými způsoby izolace, avšak my jsme se zaměřili především na chemickou a enzymatickou metodu izolace listu *Prunus laurocerasus* (česky Bobkovišeň lékařská). Vázanou látkou na kutikuly byl komerční lignohumát draselný od firmy AMAGRO, který řadíme mezi huminové látky. Ty působí velmi pozitivně na biologický materiál, zejména ovlivňují úrodnost půdy, kvalitu, růst a výnosnost rostlin. Z chemického hlediska se jedná o komplexní organické látky aromatického charakteru. V experimentální části práce je popsán průběh izolace rostlinných kutikul, jejich rozdělení na kutikuly získané z horní a spodní strany listu. Pro třídění bylo využito optického mikroskopu a samozřejmě jsou v této části rovněž popsány jednotlivé přípravy vzorků použité pro měření na isotermální mikrokolorimetrii a termogravimetrii.

Předložená bakalářská práce navazuje na diplomovou práci Ing. Marcely Laštůvkové [1] která se zabývala simulacemi foliárního hnojení přes rostlinné kutikuly realizované na kutikulách Bobkovišně lékařské izolované chemickou a enzymatickou metodou. Tyto simulace spočívaly v transportu 1 hm. % lignohumátu draselného přes rostlinné bariéry a z experimentů bylo zjištěno, že transportní procesy jsou měřitelné až po určitém čase. Na základě pilotních experimentů byla usouzena možnost vaznosti (respektive interakce) Lignohumátu na rostlinné kutikuly, a proto tyto domněnky musí být experimentálně podloženy.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši na téma vaznosti působících sloučenin na povrch listu, přesně na povrch rostlinných kutikul. Literární rešerše se zaměřuje na metody využitelné pro studium interakce rostlinných kutikul s látkami aplikovanými na jejich povrch. Významná část literární rešerše se zabývá využitím metody isotermální mikrokalorimetrie pro tento typ experimentů, coby metody využívané pro studium interakce látek.

Na základě sepsané rešerše byly provedeny experimenty a měření za využití fyzikálně-chemických metod. Pro realizaci experimentů bylo nutné provést izolace rostlinných kutikul z listu *Prunus laurocerasus* (česky Bobkovišeň lékařská), a to metodou chemickou a enzymatickou. Jedná se o běžné metody izolace používané pro studium penetrace látek skrze rostlinné kutikuly, které budou mezi sebou porovnávány.

Druhým studovaným materiálem byl lignohumát draselný (Lignohumát), kdy jeho 1 hm. % roztok byl využit pro studie vaznosti s rostlinnými kutikulami, na což byly využity metody isotermální kalorimetrie a termogravimetrie.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Huminové látky

Humus (latinsky půda nebo vegetace) je pojem označující skupinu odumřelých zbytků rostlin a organismů. Tento pojem byl v pedologii poprvé použit až v roce 1761 vědcem Valeriem [2]. *Huminové látky* (HL) tvoří převážnou část humusu.

De Saussure [3] popsal huminové kyseliny jako tmavě zbarvené sloučeniny a od té doby podléhaly mnoha výzkumům. První významnou studii původu huminových látek vykonal Sprengel [4] roku 1839. Na jeho studie navazoval švédský vědec Berzelius [5], kterému se podařilo izolovat dvě světle žlutě zbarvené huminové kyseliny z minerální vody a bahna bohatého na oxidy železa. V roce 1930 byl zaveden pojem *huminová hmota* pro tmavě zbarvené vysokomolekulární organické koloidy, které zahrnovaly veškeré huminové látky (HL) [6].

Allessandro Piccolo [6] ve své práci popisuje HL jako komplexy supramolekulárních struktur produkované biochemickými rozkladnými procesy. Struktura makromolekul je udržována slabými silami, jejími hlavními komponenty jsou alifatické kyseliny, ethery, estery, alkoholy, aromatické deriváty ligninu, polysacharidy a polypeptidy.

3.1.1 Původ, výskyt a vlastnosti huminových látek

Huminové látky jsou látky organického původu, jak rostlinného, tak živočišného. Jejich nejvýznamnějším zdrojem jsou oxyhumolity, které vznikají z hnědého uhlí a lignitu za přístupu vzduchu v dostatečně vlhkém prostředí [7]. Lignit byl definován v publikaci Barbory Mikuláškové [8] jako „*přechodný organicko-minerální substrát na cestě přeměny od rostlinné fytohmoty do vysokého stupně dehydrogenovaného/dehydratovaného a současně deoxidovaného uhlí*“. Představuje vysokomolekulární systém, který je hlavním zdrojem všech huminových látek. Ty se ve velké míře vyskytují v rašelině, v léčivých bahnech a v kompostu. Ve stopovém množství je lze nalézt ve stojatých vodách, v písčitéch a jílovitých půdách. Vznikají syntézou dekompozitů organické hmoty působením mikroorganismů procesem zvaným *humifikace* [7]. Tímto procesem je podpořena vazba mezi některými polárními a nepolárními látkami, které zvyšují biologickou schopnost přijímat živiny (stopové prvky, aminokyseliny, lipidy, aj.). Pro další vlastnosti huminových látek je důležitý také stupeň humifikace, polymerace a oxidace [6].

Jejich struktura je většinou obtížně definovatelná, protože tvoří polymerní aromatické makromolekuly. Základními prvky huminových kyselin jsou uhlík, vodík, kyslík, jejich obsah závisí na původu a způsobu přípravy. Huminové látky většinou tvoří lignoproteinové komplexy. Relativní molekulové hmotnosti jsou v rozmezí od 700 až do $2 \cdot 10^6$ Da. Podjednotky jsou spojovány řadou intramolekulárních vazeb, které umožňují vytváření sekundárních i terciárních struktur. Jejich složení závisí na mnoha parametrech, například na zdroji, na přítomnosti kovů, způsobu přípravy atd. Od toho se odvíjí různé vlastnosti těchto chemických látek [7].

Nejdůležitějšími huminovými látkami jsou huminové kyseliny (HK). Napomáhají zpevňování půdy a účastní se přenosu živin z půdy do rostlin. Udržují vodu v půdě, tím

urýchlují klíčení semen a rozvíjí půdní mikroflóru. Bakterie jsou pro půdu důležité, protože vylučují enzymy, katalyzující uvolňování vápníku a fosforu z nerozpustných fosfátů [9].

3.1.2 Teorie vzniku huminových látek

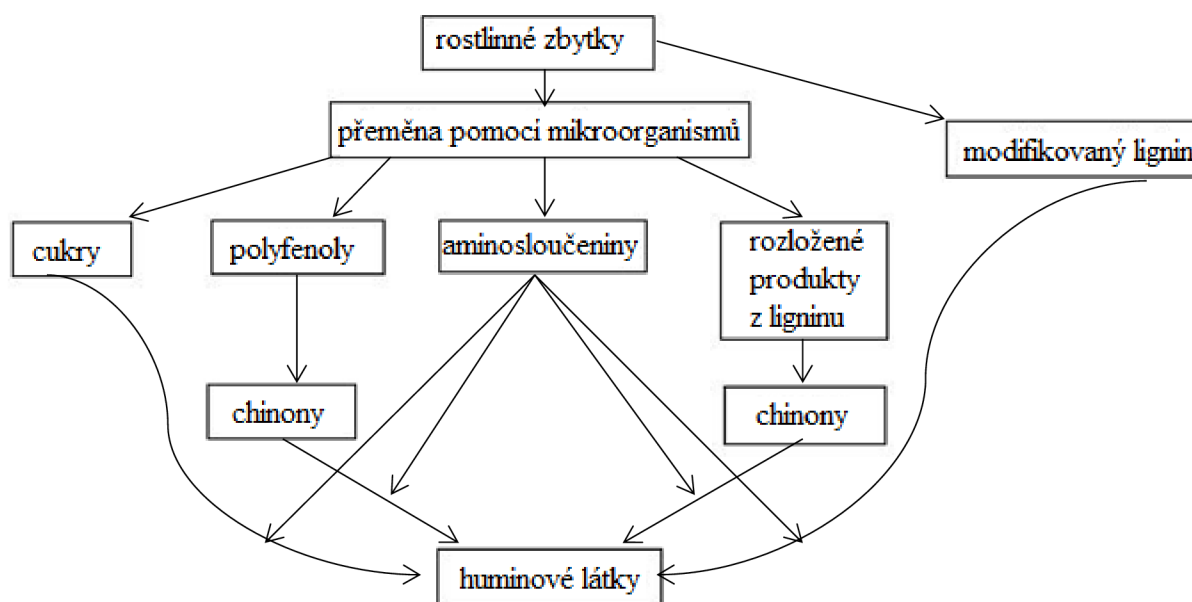
Existují různé teorie vzniku huminových látek.

První teorie byla popsána Waksmanem roku 1932, který předpokládal, že hlavním zdrojem HL je lignin, který není zcela využit půdními mikroorganismy a podléhá řadě modifikací, například demetylaci a následné oxidaci ligninu na chinony. Tyto sloučeniny jsou poté schopné z kondenzovat s aminosloučeninami a amoniakem, produkovaným mikroorganismy při rozkladných procesech. Výsledkem jsou první huminy, HK a nakonec fulvinové kyseliny (FK) [10]. Roku 1988 byla Waksmanova teorie rozšířena o poznatek, že kromě ligninu tvoří HL další biopolymery jako *cutin* a *suberin* [11].

Druhá teorie vzniku HL, tzv. Millardova teorie, je založená na kondenzaci redukujících cukrů a amino sloučenin vznikajících jako produkty mikrobiálního metabolismu [12].

Avšak nejuznávanější teorií dnešní doby je tzv. Flaigova polyfenolová teorie. Jak již z názvu vypovídá, hlavní roli při vzniku HL hrají polyfenoly. Základem je rozklad všech rostlinných biopolymerů, včetně ligninu, na jejich monomerní jednotky. Navázáním dalších jednotek, například glykosidů, taninů a produktů mikrobiálních syntéz vznikají polyfenoly. Působením enzymů se tyto organické látky mění na tzv. chinony, které podléhají polymeraci za vzniku huminových látek [13].

Teorie vzniku huminových látek jsou znázorněny na Obr. 1.



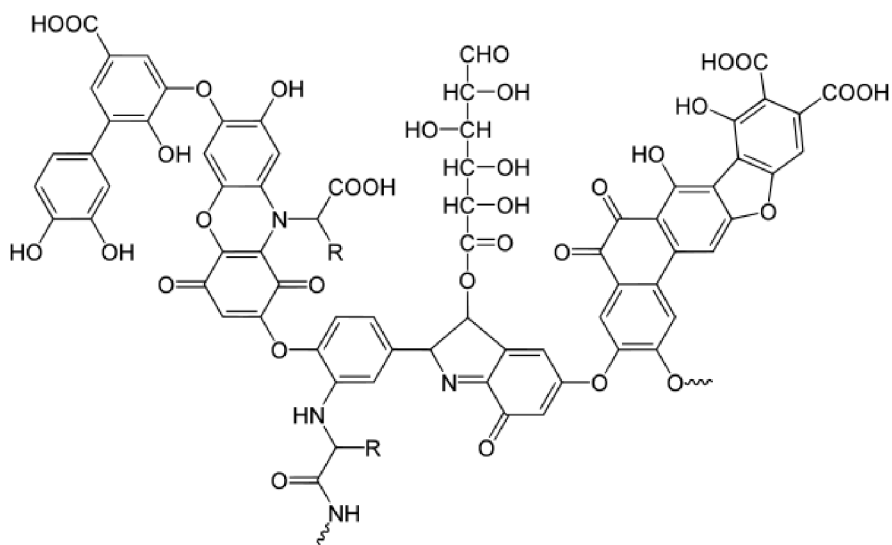
Obr. 1 Teorie vzniku huminových látek dle Stevensonovy teorie [13].

3.1.3 Dělení a struktura huminových látek

Podle rozpustnosti jsou huminové látky děleny na tři skupiny, tj. huminové kyseliny (HK), které jsou rozpustné v alkalických roztocích, fulvinové kyseliny (FK), rozpustné

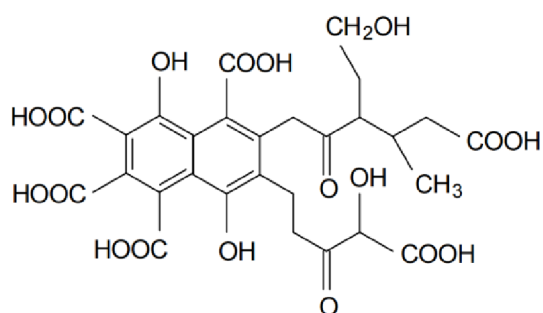
v alkalických i v kyselých roztocích a poslední huminy, které se nerozpouští ani v kyselých, ani v zásaditých roztocích [7].

Humínové kyseliny jsou aromatické komplexní sloučeniny, tvořeny alifatickými řetězci, ve své struktuře obsahují karboxylové, fenolické a hydroxylové skupiny. Mají koloidní charakter a jsou velmi odolné vůči degradačním procesům. Díky hydrofobním i hydrofilním oblastem snadno adsorbují na povrchy různých částic. Mezi další vlastnosti patří agregační schopnost, jsou acidobazické v široké oblasti pH. Významně se podílejí na zvyšování úrodnosti půd, kde zároveň zvyšují obsah živin a snižují obsah toxických látek [7]. Struktura humínových kyselin je znázorněna na Obr. 2.



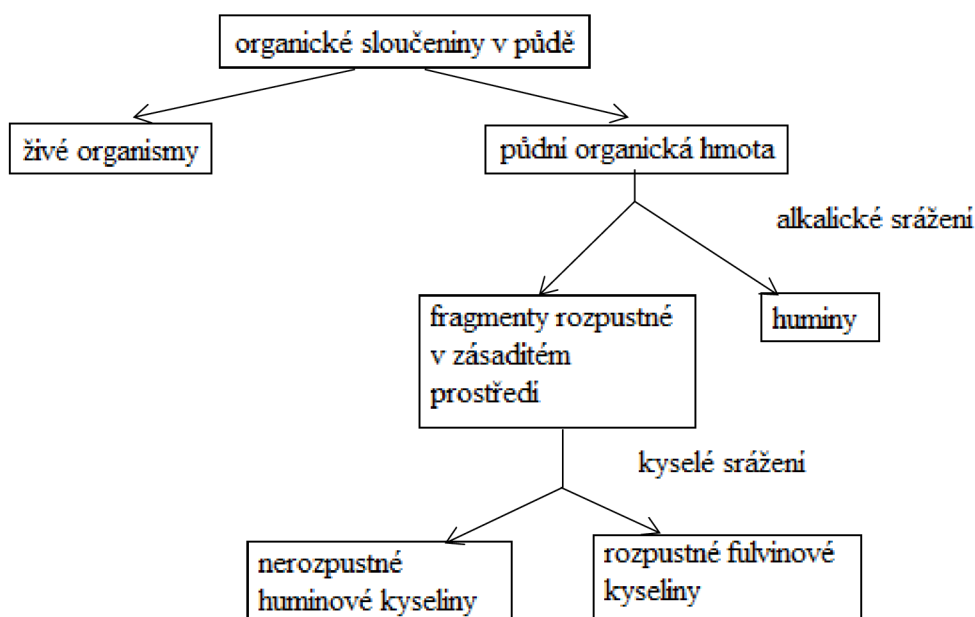
Obr. 2 Model struktury humínové kyseliny podle Stevensona [12].

Fulvínové kyseliny jsou ve srovnání s humínovými kyselinami méně polydisperzní a více hydrofilní. Obsahují více karboxylových skupin, mají proto kyselejší charakter [7], [9]. Struktura fulvínových kyselin je znázorněna na Obr. 3.



Obr. 3 Model struktury fulvínové kyseliny podle Bufflea (1977) [9].

Rozdělení humínových látek na základě rozpustnosti je popsáno na Obr. 4.



Obr. 4 Schéma rozdělení huminových látek na základě rozpustnosti [9].

Chemická struktura všech typů huminových látek je velmi podobná, protože jsou složeny ze stejných stavebních jednotek, avšak z hlediska jejich fyzikálních a chemických vlastností se liší. Základní vlastnosti popisuje tabulka s barevným schématem (Obr. 5).

HUMINOVÉ LÁTKY

fulvinové kyseliny	huminové kyseliny	huminy

→ nárůst molekulové hmotnosti →

→ nárůst obsahu uhlíku →

→ pokles obsahu kyslíku →

→ pokles kyselosti →

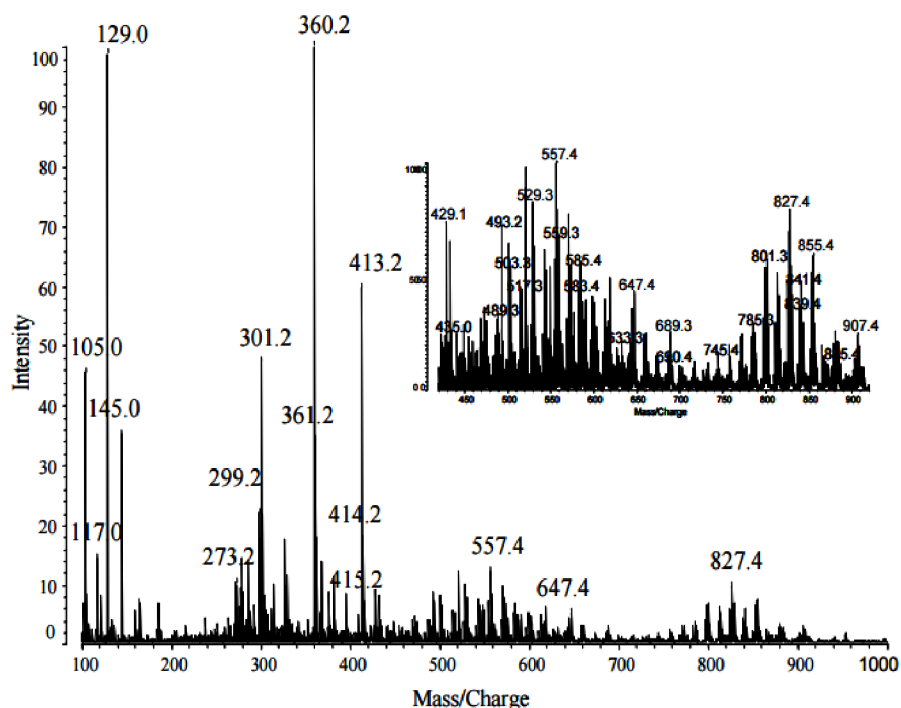
→ pokles stupně rozpustnosti →

Obr. 5 Vlastnosti a barvy huminových látek.

3.1.4 Průzkum a stanovení struktury huminových látek

V posledních desetiletích se vědci snaží definovat strukturu a složení HL pomocí různých analytických metod. Použitými metodami byly hmotnostní spektrometrie (MS), elektrosprejová ionizace (EI) a maticí asistovaná laserová desorpce (MALDI-TOF). Na začátku 21. století bylo dokázáno, že HK jsou látky o vysoké molekulové hmotnosti, které byly analyzovány za pomoci laserové desorpce (LDI-TOF). Byly zkoumány huminové

kyseliny dodané mezinárodní společností huminových látek (anglicky *International Humic Substances Society – IHSS*). Výsledná spektra pro huminové látky ze vzorků půdy, uhlí, rašeliny a rostlin byly mírně odlišné. Největší odezva v hmotnostním spektru byla zaznamenána v oblasti 120 – 1000 (podíl/hmotnost náboje) [14].



Obr. 6 LDI TOF hmotnostní spektrum huminové kyseliny (IHSS) [13].

Z výsledků MS bylo také vyvozeno, že huminové a fulvinové kyseliny mají velmi podobnou strukturu a pravděpodobně fulvinové kyseliny jsou zčásti stavební kameny huminových kyselin [13].

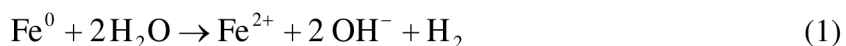
3.1.5 Použití huminových látek v praxi

Humus patří k největším přírodním zdrojům uhlíku. Stejně tak je tomu i v případě huminových látek, které jsou přidávány do hnojiv. Mají proto důležité zastoupení v agronomické oblasti, kde výrazně zvyšují produktivitu půdy. Mimo zrychlování růstu plodin je jejich pozitivním vedlejším účinkem schopnost tvořit cheláty z kovů, obsažených v půdě, které jsou pro rostlinu lépe vstřebatelné [15].

Účastní se tak například cyklu železa v půdě. Přírodní sloučeniny tohoto přechodového prvku s HL se vyskytují v zeminách a v povrchových vodách, přispívají tak k tvorbě minerálů obsahujících železo a zároveň slouží jako biologický zdroj železa pro rostliny. Povaha těchto chelátů není zcela objasněna. V tomto případě mohou HL působit jako chelatační činidla, které vážou železo v různých oxidačních stavech nebo mohou působit jako povrchově aktivní látky, které tvoří sloučeniny železa s obsahem nanočástic oxidu železato-železitého (Fe_3O_4) v koloidní formě ve vodném médiu [14].

Ve vědeckém časopise *Russian Journal Of Physical Chemistry* [15] uvedl D. Pankratov svou práci, která popisuje možné reakce kovového železa s huminovými látkami, probíhající

při omezeném přístupu vzduchu. V prvním případě může železo reagovat s vodou podle reakce:



Kovové železo reaguje s vodou pouze v přítomnosti oxidačního činidla, a to zejména v alkalickém prostředí, v této situaci jsou oxidačním činidlem HL. V druhém případě reaguje železo s funkčními skupinami HL, které vykazují kyselý charakter.



V poslední řadě reaguje železo jako redukční činidlo, kterým jsou HL oxidovány [15].

Ve výše jmenované studii byly huminové látky popsány jako multifunkční reagenty, které se účastní korozních procesů jako oxidující činidla kyselého charakteru schopné přenášet železo do roztoku, dále jako povrchově aktivní látky, stabilizující nanočástice v roztoku a jako adsorbenty ovlivňující morfologické vlastnosti železa [14].

Huminové látky jsou nespočetně užívány také v průmyslu, například při úpravě dřeva, v keramickém průmyslu. Našly své uplatnění i ve výrobě plastů zejména pro barvení Nylonu 6 nebo polyvinylchlorovaných (PVC) plastů [14].

V oblasti životního prostředí je důležitým poznáním schopnost rozpustnosti huminových a fulvinových kyselin ve vodě, proto mohou být těmito látkami přenášeny z půdy toxické látky. Díky této schopnosti byly navrženy filtry na bázi huminových kyselin, které vážou nebezpečné kovy a radioaktivní prvky ve vodě, dnes je jich využíváno k čištění splašků [14].

Huminové látky našly své uplatnění také v oblasti medicíny. Bylo prokázáno, že působí antivirově a ovlivňují krevní srážlivost. HK způsobují uvolnění aktivátoru plasminogenu, který se považuje za regulátor antitrombotického obranného mechanismu. Kromě toho inhibují tvorbu koagulačního enzymu thrombinu a tak potlačují syntézu fibrinu z fibrinogenu, způsobující krevní sraženiny. Dále byla mnoha vědci zkoumána schopnost huminových látek chránit tělo před ultrafialovým zářením. Rovněž byly zkoumány interakce HL s herbicidy, fungicidy, insekticidy a různými farmaceutickými výrobky [9].

Můžeme předpokládat, že se HL stanou předmětem dalšího důležitého výzkumu v oblasti fyzikální, analytické chemie, biochemie nebo chemie životního prostředí.

3.2 Biologie listu

List je postranní orgán cévnatých rostlin, který se tvoří pouze na stonku. Z hlediska stavby je rozčleněn na plochou listovou čepel a řapík. Listy vyrůstají v uzlinách stonku a jsou zákonitě uspořádány. Hlavní funkcí listů je syntéza organických látek (asimilátů), odpařování vody (transpirace) a výměna plynů [16].

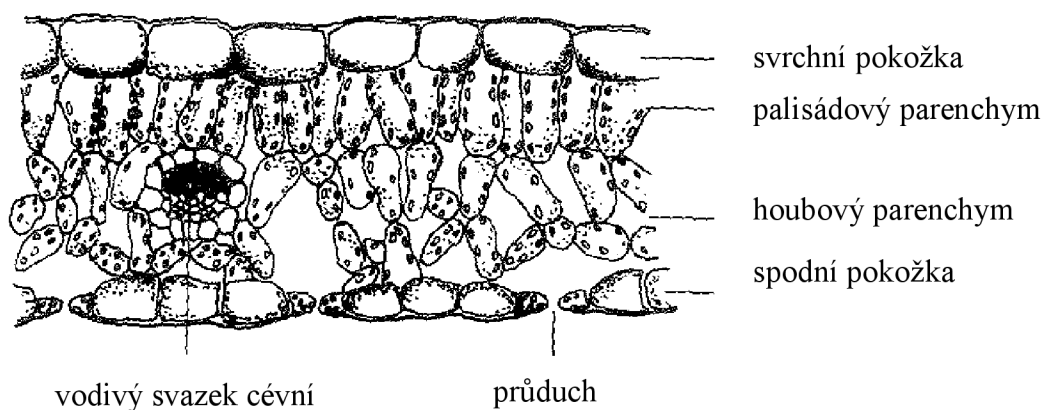
3.2.1 Stavba listu

Na příčném řezu listem (Obr. 7) rozlišujeme *pokožku*, *mezofyl* a *cévní svazky*.

Listová pokožka se nachází na svrchní i na spodní straně listu a je kryta tenkou membránou zvanou kutikula. Svrchní kutikula je tvořena rozsáhlou pletivovou sítí, spodní kutikula navíc obsahuje průduchy (stomata) [16].

Mezofyl vyplňuje prostor mezi svrchní a spodní stranou pokožky a je rozlišen na palisádovitý parenchym, vykazující protáhlé buňky s velkým počtem chloroplastů, a houbový parenchym, který má buňky nepravidelného tvaru, obsahuje méně chloroplastů a jeho hlavní funkcí je odvádět asimiláty do lýka cévních svazků [16].

Cévní svazky mají vodivou a zpevňující funkci v listu. Od mezofylu jsou odděleny parenchymatickou nebo sklerenchymatickou pochvou. Tvoří tzv. žilnatinu listu [16].



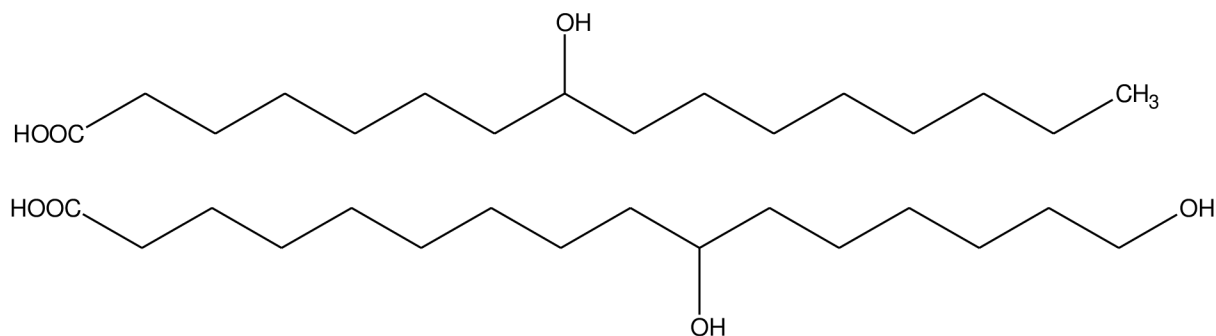
Obr. 7 Řez listem [16].

3.2.2 Listová kutikula

Listová kutikula se řadí mezi složené systémy krycích pletiv rostlin, které jsou organizovány do spolupracujících celků. Kutikula pokrývá pokožku listu z obou stran a upravuje chemický i mechanický charakter vrstev listu. Rostliny jsou proto chráněny před působením mikroorganismů a vlivy vnějšího prostředí. Kutikula má i funkci kontroly difúze molekul, reguluje výměnu plynů a zároveň zabraňuje ztrátám vody. Struktura kutikuly všech částí rostliny se mírně liší, je přítomna na vnějším povrchu epidermálních buněčných stěn listů, primárních stonků, květů a plodů [17].

Vědci Riederer a Schönherr [18] se zabývali propustností a složením kutikulárních membrán a ve svém článku uvedli, že se kutikuly skládají ze dvou typů lipidů, rozpustné lipidy a nerozpustný kutin. Kromě těchto složek obsahují kutikuly průměrně 21 % dalších nelipidických složek. Přesto, že se kutikuly skládají převážně z lipidů, jsou schopny sorbovat a akumulovat lipofilní sloučeniny. Sorpce chemických látek do kutikuly je velice důležitá kvůli rozpoznání množství potenciálních škodlivin, přijímané rostlinou z prostředí. Tloušťka kutikuly se pohybuje v rozsahu 0,5 až 14 μm [18].

Jak již bylo řečeno, hlavní hydrofobní složkou rostlinného epidermu je nerozpustný polymer *kutin*, jehož struktura je na Obr. 8, *kutan* a vosky. Kutin tvoří přibližně 40 % až 80 % kutikuly. Je definovaný jako oxidovaný řetězec polymeru mastných kyselin spojených příčnou esterovou vazbou. Mastné kyseliny v řetězci obsahují hydroxylové a epoxidové skupiny většinou na opačném konci řetězce jako karboxylové skupiny [19].

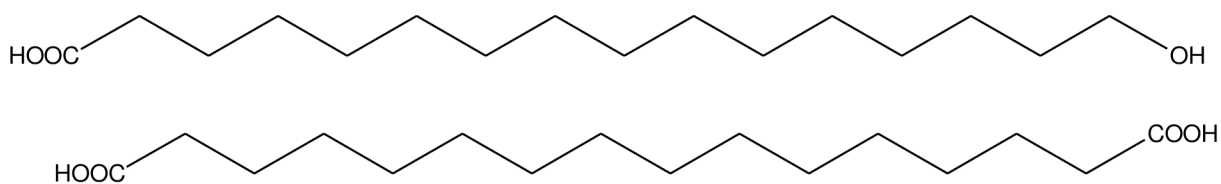


Obr. 8 Vzorec kutinu.

Kutikula tvoří vícevrstvou strukturu povrchu rostlin. Horní část je potažena vrstvou vosky, následuje vrstva kutinu, který navázáním na vosky tvoří tzv. *vlastní pokožku*. Spodní část je tvořena kutinem spolu s vosky, které navíc obsahují směs pektinu, celulosy a jiných sacharidů [20].

Kutin bývá depolymerizován a jeho monomerní jednotky se zpět pojí neesterovou vazbou. Tento zbytek lipidového charakteru se nazývá kutan. Kutin a kutan se v rostlinných kutikulách vyskytují v různých poměrech [21].

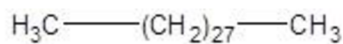
Složkou podobného charakteru jako kutin, tvořící část kutikuly je *suberin*. Je to typ nerozpustného polyesteru mastných kyselin a glycerolu, podílí se na tvorbě membrány a má funkci ochrany proti vlivům vnějšího prostředí. Od kutinu se odlišuje chemickým složením a strukturou, ve které navíc obsahuje dikarboxylové a fenolické skupiny [21].



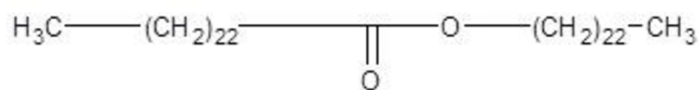
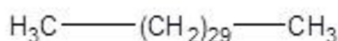
Obr. 9 Vzorec suberinu.

Další důležitou složkou jsou *wosky*. Kutikulární vosk je obecný termín pro popis komplexní směsi homologické řady dlouhého alifatického řetězce jako alkany, alkoholy, aldehydy, mastné kyseliny a estery, ale také cyklických sloučenin a dalších organických kyselin, kutikula může také obsahovat menší množství polysacharidů a aminokyselin [22].

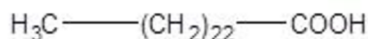
lineární řetězce alkanů



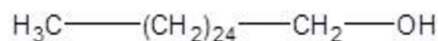
estery mastných kyselin



dlouhé řetězce mastných kyselin



dlouhé řetězce alkoholů



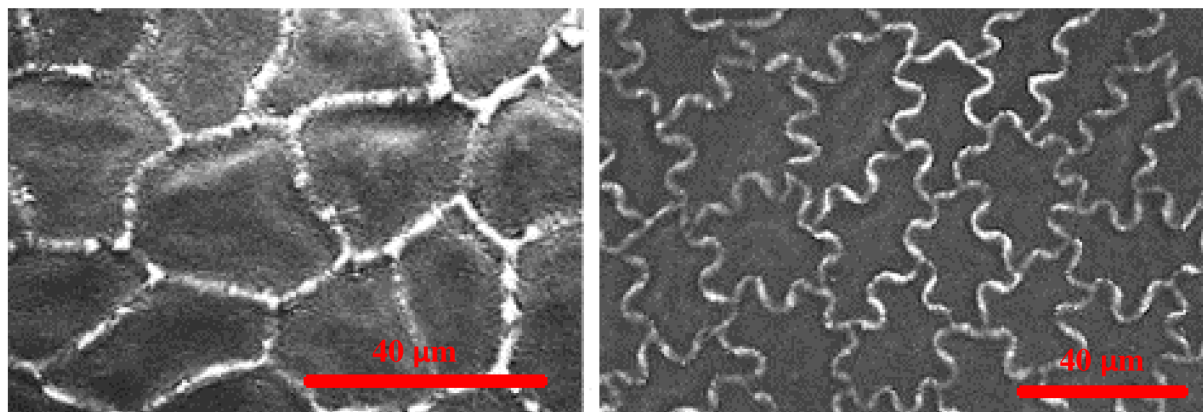
Obr. 10 Části komplexní směsi tvořící strukturu voskových látek.

Z teorie stavby kutikuly je možné vyvozovat, že se jedná o vysoce specializovaný systém, umožňující ochranu listu, působí proti vlivům vnějšího prostředí, znemožňuje průchod cizích patogenů a zároveň reguluje transport vody a živin do struktury listu, což je zprostředkováno stomaty. Na základě popsaných poznatků bylo možné studovat schopnost kutikuly absorbovat potřebné látky [21].

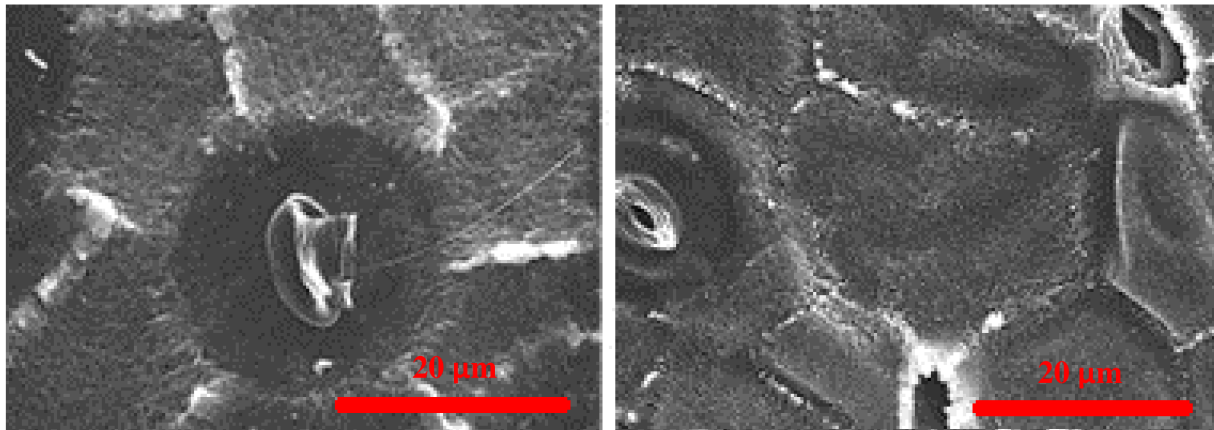
3.2.3 Mikromorfologie listové kutikuly

Jak již bylo řečeno v Kapitole 3.2.2, listová kutikula abaxiální (spodní) a adaxiální (horní) strany se mírně liší. Na kutikule lze zkoumat charakteristiky jako vedlejší buněčný tvar, velikost stomat, uspořádání pomocných buněk, tvar antiklinálních (orientované kolmo k povrchu) a periklinálních (orientované rovnoběžně s povrchem) buněčných stěn, struktura buněčné stěny, aj. [21].

Kutikuly byly mnoho let zkoumány za účelem zpřesnění taxonomie. Výzkum byl prováděn pomocí klasických optických mikroskopů, pro lepší výsledky byly používány rastrovací elektronové mikroskopy (anglicky Scanning Electron Microscopy – SEM) [23].



Obr. 11 Snímek horních kutikul pořízený pomocí SEM, *Fagus lucida* (vlevo) a *Fagus grandifolia* (vpravo) [23].



Obr. 12 Snímek kutikul spodní strany listu pořízený pomocí SEM [23].

Obr. 11 zobrazuje rovný a zvlněný typ antiklinálních stěn na horních kutikulách. Na pořízených snímcích (Obr. 11 a Obr. 12) je viditelný rozdíl mezi horní a spodní kutikulou. Spodní kutikula obsahuje *stomata* (průduchy), zajišťující transport vody, kyslíku apod. [23].

3.3 Foliární hnojení a funkce rostlinných kutikul

Základem optimálního růstu a vývoje rostlin je zajištění jejich požadavků, které umožňují pěstiteli zvýšit využití genetického potenciálu rostlin a zachovat dobrou kvalitu produktu. Základem správně provedené výživy je udržení dobré půdní úrodnosti, která příznivě ovlivňuje fyzikální, chemické a biologické vlastnosti půdy [23].

Výzkum foliárního hnojení započal v polovině dvacátého století. Na začátku 80. let byly prováděny studie k optimalizaci aplikace foliárních hnojiv pro jednotlivé plodiny. Zájem o listové hnojení se zvyšoval také díky rozvoji mechanických strojů pro aplikaci hnojiv, což znamenalo pokrok v zemědělství. Nový způsob hnojení snížil náklady na produkci plodin, dopad na životní prostředí a zachovala se kvalita půdy [24].

Při mimokořenové (listové) výživě jde o příjem a využití minerálních i organických živin rozpustných ve vodě, které jsou aplikovány na nadzemní části rostlin. Tenhle způsob hnojení má svá omezení, která jsou dána nízkou penetrační rychlostí, závislé na tloušťce kutikuly, nízkou propustností hydrofobního povrchu, nízkou účinností v důsledku srážek následujících po listové aplikaci živin, rychlým vyschnutím roztoku vlivem vysoké teploty a nízké vlhkosti vzduchu [25].

Ovlhčení povrchu listů je možné ovlivnit přidáním detergentů k roztoku. Po jejich aplikaci kutikula bobtná a umožňuje tak kontakt roztoku s buňkami epidermálních částí listů. Po překonání kutikulární bariéry vstupují živiny do tzv. volného prostoru, kterým pronikají do hlubších vrstev mezofylu. Pro absorpci listové buňky platí, že rychleji jsou absorbovány kationty, a to s jednotkovým nábojem. Vlastní využití živin v metabolismu je závislé nejen na rychlosti příjmu ale i na mobilitě živin. Intenzita příjmu živin bude vyšší u rostlin s nedostatečným obsahem oproti dobře zásobené rostlině touto živinou. To dokazují výsledky experimentu uvedeného v Tab. 1 [25].

Tab. 1 *Příjem a transport fosforu (³²P) listy ječmene při jeho aplikaci na listy* [25].

Účinek	příjem a transport ³² P (μmol ³² P/g sušiny listů/h)	
	kontrolní rostliny	rostliny s nedostatkem ³² P
Příjem ³² P listy	5,29 ± 0,54	9,92 ± 2,17
Transport ³² P z ošetřených listů	2,00 ± 0,25	5,96 ± 1,08
Transport P do kořenů	0,63 ± 0,04	4,38 ± 0,42

Své opodstatnění má mimokořenová výživa k odstranění krátkodobých deficitů zvláště v raných fázích vývoje nebo v období reprodukčních fází, kdy se snižuje aktivita kořenového systému [25].

3.3.1 Faktory ovlivňující příjem živin

Příjem živin listy je ovlivněn vnějšími podmínkami, jako jsou koncentrace živin v roztoku, valence iontů, teplota, vlhkost a vnitřními faktory, mezi které řadíme metabolickou aktivitu rostlin [25].

Na rozdíl od kořenového příjmu je listová absorpce významně stimulována světelným zářením. Řada autorů uvádí, že se při přímém vystavení slunečnímu záření zvyšuje obsah vosků v kutikule a tím klesá intenzita příjmu živin. Vliv na příjem živin má také množství dešťových srážek, teplota a vlhkost vzduchu. Během dne, kdy dochází ke zvyšování okolní teploty, se snižuje relativní vzdušná vlhkost, což vede k odpařování vody a vysušování roztoku na listech. Pro každý roztok je charakteristická hodnota relativní vzdušné vlhkosti, nad kterou zůstává roztok kapalný, pod jeho hodnotou dochází k vysychání. Zvýšená vlhkost vzduchu zvyšuje sorpci vody kutikulou a tím propustnost pro iontové roztoky [25].

Foliární hnojení zároveň vyžaduje dostatečnou velikost plochy listu pro možnost absorpce aplikovaného živného roztoku. Koncentrace živin a denní teplota by měly být optimálně zvoleny, aby nedošlo ke spálení listů. Pro lepší účinnost je většina hnojiv rozpustná ve vodě [25].

Dalším faktorem ovlivňující příjem živin je stáří listu. Obecně platí, že mladé, částečně vyvinuté listy jsou více propustné v porovnání s listy staršími. Rovněž poškození listů má vliv na permeabilitu listů [25].

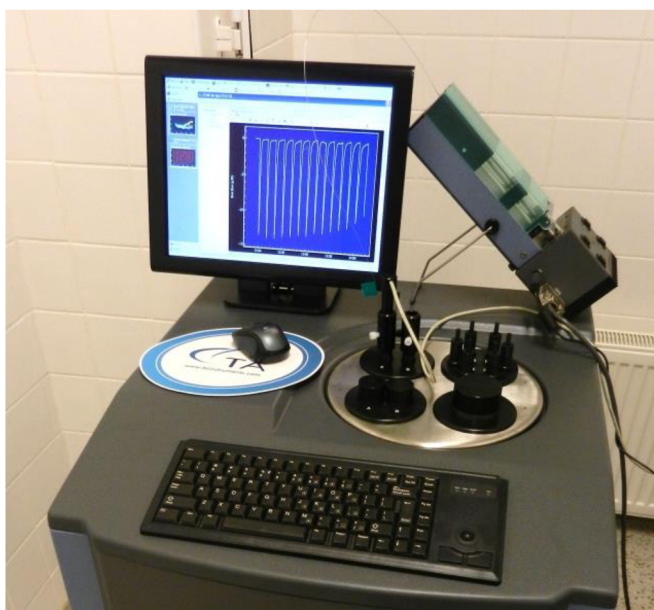
3.4 Využití fyzikálně-chemické metody

Pozornost bude nyní věnována kapitole popisující fyzikálně-chemické metody využití k samotnému stanovení interakce Lignohumátu s listovou kutikulou. K získání potřebných dat byly využity metody termické analýzy, což jsou jedny z nejdůležitějších fyzikálně-chemických technik sloužících k analýze širokého spektra materiálů. Princip metod spočívá v monitorování změn vlastností materiálu při určitém teplotnímu režimu (zahřívání, chlazení nebo konstantní teplota) [25].

3.4.1 Modulární titrační mikrokolorimetrie

Modulární mikrokolorimetr pro simultánní měření s vysoce citlivým termostatem umožňuje charakterizovat nejen tepelné zabarvení chemických reakcí, ale poskytuje také informace o procesech doprovázených tepelnými změnami. Součástí přístroje je kalorimetr pro měření izotermické titrační kalorimetrie (ITC) s ocelovou celou, perfúzní cela pro studium hydratace vzorku díky nastavitelné vlhkosti inertního plynu, sestava šesti kalorimetrů pro simultánní měření až šesti vzorků při jednom experimentu a kalorimetr pro měření rozpouštěcího tepla kapalných, tuhých i gelových vzorků [26].

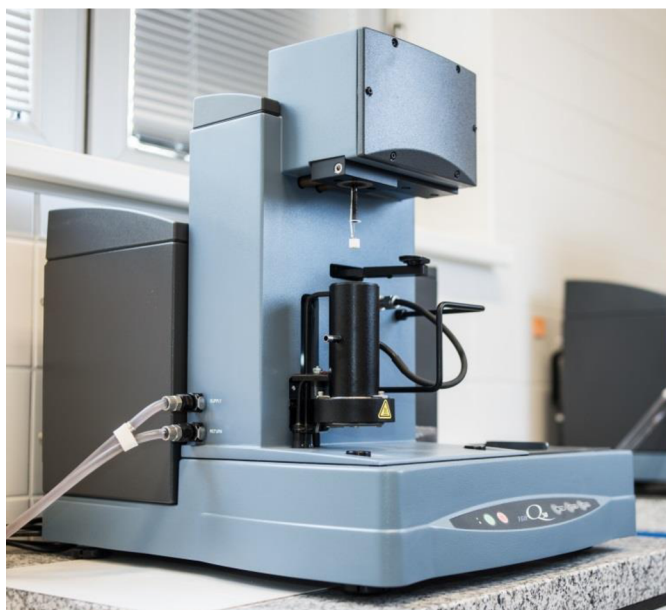
Přístroj, zobrazený na Obr. 13 umožňuje pracovat v izotermickém, krokově izotermickém nebo teplotně skenovacím režimu a ve všech případech koriguje případnou teplotní změnu vzorku jako odezvu na probíhající děj. Výsledkem analýzy jsou kvalitativní i kvantitativní údaje o termodynamickém chování vzorku [26].



Obr. 13 Modulární mikrokolorimetr TAM III [26].

3.4.2 Termogravimetrická analýza

Nejjednodušší metodou termické analýzy je termogravimetrická analýza (TGA) a přístroj pro měření se nazývá termogravimetrický analyzátor (Obr. 14) Vzorek je obvykle vystaven tepelnému namáhání a na citlivých mikrováhách je sledována změna jeho hmotnosti v závislosti na čase nebo teplotě. Nejčastějším procesem, při kterém dochází ke změně hmotnosti vzorku, je jeho degradace během zahřívání. TGA ovšem umožňuje sledování dalších procesů, jako jsou sublimace, vypařování, oxidace nebo elektrická a magnetická transformace. Z toho vyplývá opravdu široké využití TGA metody [27].



Obr. 14 *Termogravimetrický analyzátor TGA Q5000* [27].

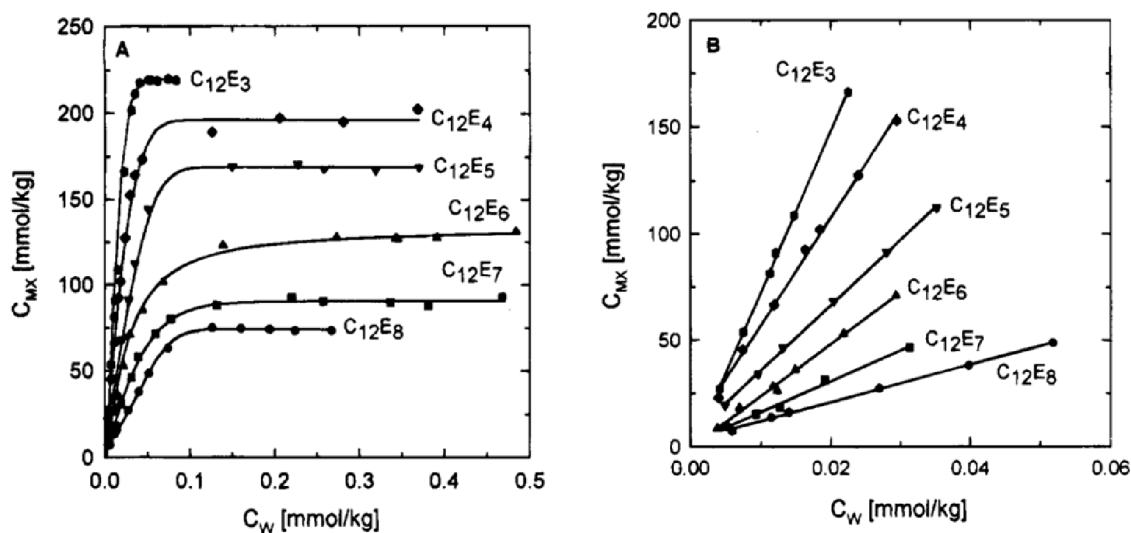
Měření probíhá ve volitelné atmosféře, buď v inertní (dusík, argon) nebo oxidační (vzduch). TGA snadno a rychle stanovuje tepelnou nebo tepelně-oxidační stabilitu vzorku a pomocí analýzy degradace materiálu je pak možno usuzovat jeho složení, obsah, vlhkost a obsah organické i anorganické hmoty. U složitějších experimentů navíc může být měřena časová stabilita materiálů při zvolené teplotě. Měřit lze od laboratorní teploty do vysokých teplot nad 1 000 °C. Nosičem vzorku je tzv. pánvička, zhotovená z platiny, využívaná pro měření do 800 °C, pro měření za vyšších teplot se využívá keramická pánvička [27].

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Plynová chromatografie v modifikaci headspace

Metoda byla použita pro měření sorpce alkohol-ethoxylátů na kutikulách listu pomerančovníku hořkého (latinsky *Citrus aurantium*). Využité alkohol-ethoxyláty (např. diethylenglykolmonobutylether) mají význam v oblasti foliárního hnojení jako urychlovače penetrace účinných látek do struktury listu, protože způsobují zvýšení pohyblivosti penetrované látky v listové kutikule [28].

Izolace kutikul byla provedena enzymatickou metodou navrženou vědci Schönherrem a Riedererem [18] a izolované kutikuly byly dále extrahovány v chloroformu. Ke stanovení sopřní izotermie byly připraveny roztoky s různou koncentrací sorbátu ve vialkách, do kterých byly vloženy kutikuly na 20 hodin při konstantní teplotě 25 °C. Po uplynutí této doby byly kutikuly vyjmuty z roztoku a sušeny na vzduchu po dobu 24 hodin. Množství sorbátu ve vzorku bylo měřeno pomocí plynové chromatografie [28].



Obr. 15 Izotermie popisující sorpci série alkoholethoxylátů na kutikuly listů pomerančovníku hořkého [28].

Graf na Obr. 15 znázorňuje sorpční izotermie alkohol-ethoxylátů na listových kutikulách. Koncentrace sorbátu v membráně (C_{MX}) a koncentrace ve vodné fázi (C_W) byly stanoveny metodou plynové chromatografie. Rovnovážné koncentrace v kutikulách se lišily s koncentracemi ve vodném supernatantu. Sorpční izotermie mohou být charakterizovány třemi základními rysy – lineární závislost, relativně ostré inflexní body a úsek s nulovým sklonem s konstantními hodnotami C_{MX} (Obr. 15 – vlevo). Z vynesené závislosti plyne, že závislost množství sorbované látky na vnější koncentraci sorbátu je lineární pouze při jeho nízkých koncentracích (Obr. 15 - vpravo) [28].

Stejná metoda byla aplikována pro měření distribuce těkavých alkanů mezi plynem, ovocnými kutikulami a vodnou fází. Ze vzorků kutikul byla soxhlet extrakcí odstraněna vnější vrstva vosků pomocí chloroformu. Kutikuly byly vloženy do ampulek a naměřené množství kapaliny nebo plynu bylo aplikováno do ampulek pouze na stěny, aby nedošlo k přímému kontaktu kutikuly s roztokem. Všechny aplikované roztoky byly testovány v ampulích

bez přístupu vzduchu. Množství penetrované látky bylo určeno rozdělovacím koeficient, který je stanoven poměrem množství látky v plynu a v kutikule, který byl měřen metodou plynové chromatografie.

$$C_{MX} = \frac{C_{A0}V_A - C_A(V_{A0} - V_{MX})}{V_{MX}} = \frac{V_A}{V_{MX}}(C_{A0} - C_A) + C_A, \quad (3)$$

kde C_{MX} je koncentrace v kutikule, C_{A0} je koncentrace vypařené fáze v referenční vialce, C_A je koncentrace vypařené fáze ve vialce s roztokem a V_{A0} je objem vialky (stanovená gravimetricky), V_{MX} je objem vzorku [29].

4.2 Kapalinová scintilační spektrometrie

Metoda je založená na principu měření radioaktivity. Byla využita při zkoumání vlivu kutikulárních vosků při penetraci organických látek do rostlinných kutikul [30].

Pro měření bylo nutné provést extrakci voskové vrstvy kutikuly vložení kutikuly do chloroformu. Po extrakci byly kutikuly usušeny, zváženy a umístěny na agarové bloky. Na každou kutikulu byla nanášena 1 μ l kapka penetrovaného roztoku a po jejím vypaření byly kutikuly odděleny od agaru, byly několikrát omyty destilovanou vodou vždy o stejném objemu, následně byly rozpuštěny v roztoku zvaném *Lumasolve* (Lumac, Packard). Radioaktivita byla stanovena ve vodě, která omývala kutikuly, v agaru a v rozpuštěných kutikulách pomocí *Lipoluma* (Packard) scintilační tekutiny. Výsledky sorpce byly vyjádřeny jako procento totální radioaktivity vztažené na jednotlivé komponenty [30].

Výsledky měření potvrdily, že kutikulární vosky mají efekt při penetraci organických látek do rostlinných kutikul. Bylo zjištěno, že efekt extrakce vosku na přenos skrz kutikulu závisí na lipofilní nebo hydrofilní charakteristice chemických látek a na struktuře kutikuly. Z výsledků měření bylo vyhodnoceno, že difúze látek skrz kutikuly bez extrakce vosku byla nízká, s extrakcí se přenos nepatrně zvýšil [30].

4.3 Ultrafialová spektrofotometrie

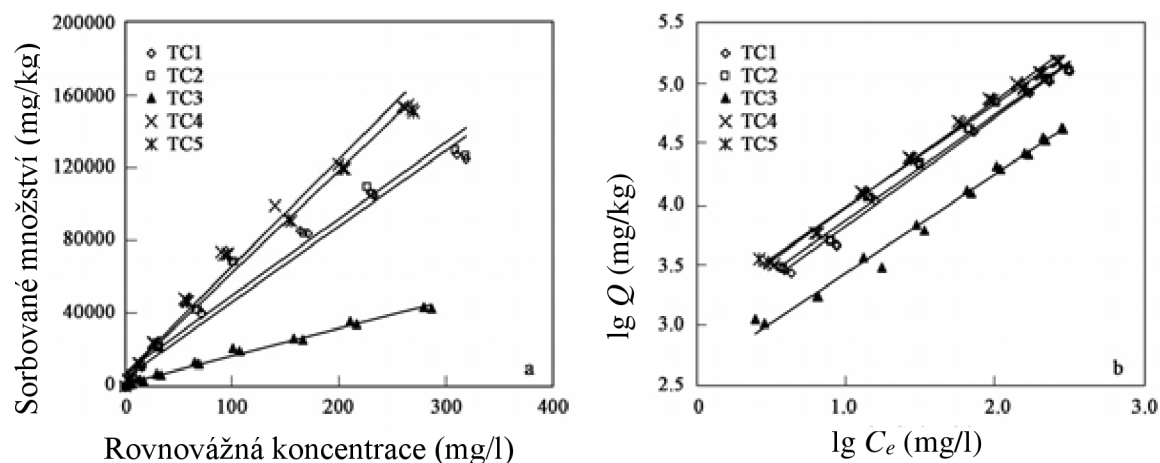
Hlavním cílem studie [31] byl průzkum sorpce 1-naftolu na izolované rostlinné kutikuly a pochopení sorpční aktivity v závislosti na množství vosků ve struktuře kutikul. Naftol byl vybrán, protože jako derivát naftalenu je jednou ze složek pesticidů.

Všechny sorpční izotermy kutikulárních frakcí byly získány použitím dávkovací techniky. Naftol byl rozpuštěn v roztoku chloridu vápenatého pro udržení konstantní iontové síly a azidu sodného kvůli zabránění degradace. K měření sorpce organické látky bylo použito 9 různých koncentrací sorbentu a každá z nich, včetně blanku, byly duplikovány. Takto připravené vzorky byly přikryty teflonovým víčkem a byly umístěny na rotační třepačku, kde byly ponechány 3 dny. Roztok byl oddělen od pevných látek centrifugací. Alikvotní podíl supernatantu byl odstraněn a zředěn deionizovanou vodou. Ke zvýšení citlivosti stanovení byl analyzovaný vzorek zředěn 0,1 M hydroxidem sodným, k ujištění se, že se naftol nachází v disociovaném stavu. Rovnovážná koncentrace naftolu byla měřena použitím ultrafialového spektrofotometru typu UV-2550 při vlnové délce 332 nm. Kvůli malé sorpci naftolu na stěnách vialek bylo sorbované množství vypočteno z hmotnostního rozdílu [31].

Všechna sorpční data byla dosazena do logaritmické formy Freundlichovy rovnice:

$$\log Q = \log K_f + N \log C_e, \quad (4)$$

kde Q je koncentrace v pevné fázi (mg/kg) a C_e je koncentrace v kapalně fázi (mg/l). K_f je koeficient sorpční kapacity ((mg/kg)/(mg/l)^N) a N je bezrozměrný parametr udávající směrnici izotermy, určené z lineární regrese dat. Závislosti jsou znázorněny na Obr. 16 [31].



Obr. 16 Sorpční izotermy 1-naftolu v různých kutikulárních frakcích (TC1-TC5). (a) Lineární regrese, (b) Freundlichova regrese [31].

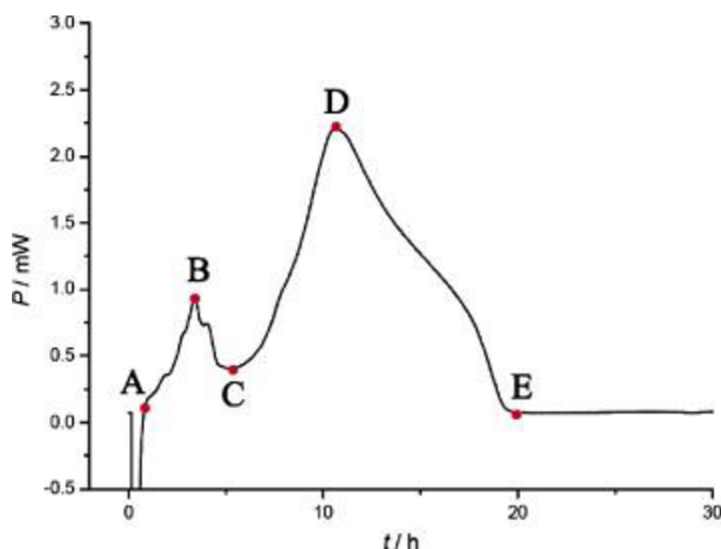
Z výsledků bylo odvozeno, že množství sorbované látky závisí na množství organického uhlíku v kutikulární struktuře (alifatické lipidy – vosky), kterého bylo nejvíce v kutikulární frakci TC5, naopak ve frakci TC3 bylo uhlíku nejméně [31].

4.4 Mikrokolorimetrie

Mikrokolorimetrie je obecně kvantitativní, levná a všestranná metoda, aplikovaná v oblastech chemie, fyziky i biologie. Tato metoda je velmi vhodná pro pozorování tepelných změn, které vznikají například při růstu mikrobiálních buněk. Charakterizace procesu buněčného růstu se používá k pozorování interakce mezi buňkou a léčivem. Tato metoda našla rovněž široké uplatnění v oblasti studia antimikrobiálních vlastností berberinových alkaloidů [32], toxického řešení chromových iontů na metabolismu *Tetrahymena thermophila* [33] či v akutní toxicitě diktyltinu na imunitní systém potkanů [34].

4.4.1 Zkoumání účinků alkaloidů na bakterii *Escherichia coli*

Vědci Yan s kolegy se ve své práci [32] věnovali výzkumu působení některých alkaloidů na růstu bakterie *Escherichia coli*. Inhibiční účinky tří vybraných alkaloidů byly měřeny metodou mikrokolorimetrie, která zaznamenává změnu tepelného toku v závislosti na čase, čímž je získán graf (Obr. 17), z něhož je možné stanovit parametry určující metabolické změny. Těmi jsou rychlostní konstanty k , maximální hodnota tepelného výkonu P , čas vzniku maxima píku t_p a celková produkce tepla Q_t [32].



Obr. 17 Izotermická křivka znázorňující účinek alkaloidu na *E. coli* vynesena pomocí TAM [32].

Graf na Obr. 17 znázorňuje proces monitorovaný mikrokalorimetrem za izotermických a izochorických podmínek. Znázorňuje metabolismus *Escherichia coli*, který je rozdělen na exponenciální fázi (A – B), fázi opožděnou (B – C), druhou exponenciální fázi (C – D) a fázi poklesu (D – E). Růstový metabolismus bakterie může být tak rozdělen do dvou růstových procesů, kdy jeden dosahuje svého maxima v bodě B a druhý v bodě D [32].

Probíhající děje můžeme matematicky řešit vztahem:

$$\ln\left(\frac{P_t}{P_0}\right) = k \cdot t, \quad (5)$$

kde P_0 je tepelný výkon na začátku procesu a P_t je výkon v čase t . Rychlostní konstanta byla získána z lineární závislosti $\ln P_t$ na t [32].

Tab. 2 Růstové rychlostní konstanty k_1 a k_2 bakterie *E. coli* určené metodou TAM při teplotě měření 37 °C [32].

číslo experimentu	1	2	3	4	5	6
k_1 [h ⁻¹]	0,97342	0,97361	0,97289	0,97382	0,97338	0,97418
k_2 [h ⁻¹]	0,36641	0,36682	0,36611	0,36579	0,36711	0,36517

Z uvedené tabulky (Tab. 2) je zřejmé, že rychlostní konstanta k_2 je mnohem menší než rychlostní konstanta k_1 , z čehož plyne, že druhá exponenciální fáze může být považována za součást stacionární fáze [32].

Výsledky měření vykazovaly nepřímou závislost rychlosti růstu na koncentraci alkaloidů, tzn. že výzkum potvrdil, antimikrobiální účinky použitých alkaloidů, protože inhibovaly růst *E. coli* s nárůstem jejich koncentrace [32].

4.4.2 Zkoumání účinků hnojení na mikrobiální aktivitu v půdě

Dlouhodobým experimentem, jehož účelem byl výzkum účinků vyrovnaného a nedostatečného nutričního hnojení na půdní mikrobiální aktivitu, se zabývali Zheng a vědci čínské akademie věd [35]. Pro měření mikrobiální aktivity využili metodu mikrokalorimetrie

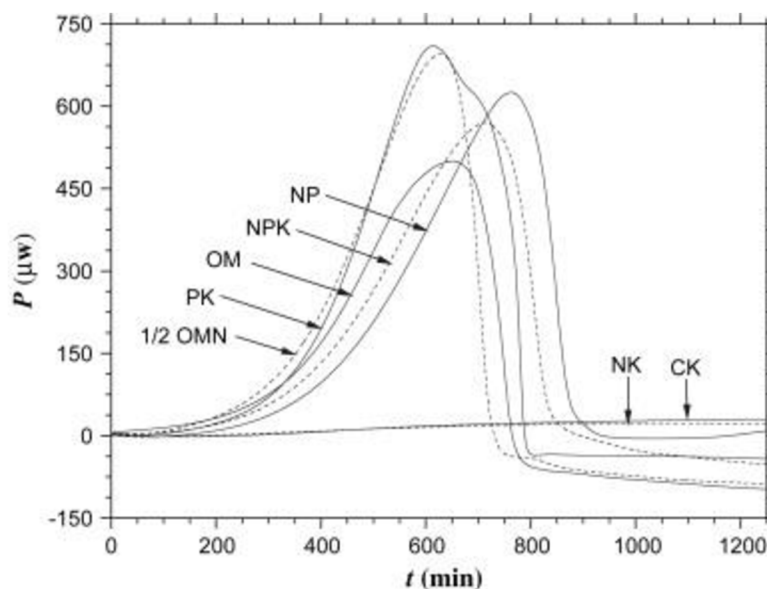
a z výsledků stanovili konstantní rychlost mikrobiálního růstu a popsali procesy vývoje tepla. Měření probíhalo ze vzorků půdy, do kterých byla přidána glukóza a sulfát amonný pro stimulaci mikrobiální aktivity a různá hnojiva s různým obsahem dusíku, fosforu a draslíku [35].

Metabolické aktivity půdních mikroorganismů byly hodnoceny monitorovacím zařízením TAM III, což je vícekanálový mikrokcalorimetrický systém kalibrovaný uvolněním elektrické energie v rezistoru. Při izotermických podmínkách byl zaznamenáván tepelný průtok a termodynamické parametry, tj. rychlostní konstanta růstu k , maximální tepelný výkon P_{\max} , čas dosažení maxima píku t_{\max} a celkové uvolněné teplo Q_t , byly zjištěny pomocí P - t (Power-time) křivky [35].

Rychlostní konstanta k poskytuje kvantitativní index mikrobiální aktivity a platí následující kinetická rovnice:

$$\ln P_t = \ln P_0 + kt, \quad (6)$$

kde t je čas, P_t je výkon v čase, a k je rychlostní konstanta růstu. Hodnoty P_{\max} a t_{\max} byly získány přímo z křivky uvedené na Obr. 18 [35].



Obr. 18 Křivka závislosti výkonu na čase ze vzorků půdy obohacené o různá hnojiva, CK značí vzorek bez hnojiva, NK, PK, NP NPK minerální hnojiva, 1/2 OMN polovinu organického a polovinu minerálního hnojiva, OM organický hnůj [35].

Všechny P - t křivky znázorňují typický proces mikrobiálního metabolismu. Tepelný tok se exponenciálně zvyšoval až do vzniku stacionární fáze a fáze klesající. Z grafu je viditelné, že změny v mikrobiální aktivitě závisely na živinách dostupných v půdě. CK (bez hnojiva) neprojevoval žádnou změnu, na rozdíl od ostatních vzorků, u nichž je pozorovatelný peak. Nejvyšší mikrobiální aktivitu projevoval vzorek PK s obsahem minerálního hnojiva [35].

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

a) Enzymatická metoda izolace rostlinných kutikul

Chemikálie	čistota	výrobce
kyselina citrónová	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

b) Chemická metoda izolace rostlinných kutikul

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

c) Penetrovaný roztok HL

lignohumát draselný	Amagro s.r.o
---------------------	--------------

5.2 Použitá instrumentace a další zařízení

pH metr WTW pH 330

Mikroskop Nikon Eclipse e200

Termogravimetrický analyzátor TGA Q5000

Modulární mikrok calorimetr TAM III

Optický mikroskop (Olympus BX 50 s přídavným světelným zdrojem (Olympus TH 4 – 200) s digitálním fotoaparátem (Olympus Camedia C – 4040Zoom)

5.3 Separace rostlinných kutikul z listů

Pro studium penetrace Lignohumátu do rostlinných kutikul, byly kutikuly separovány z listů a to dvěma metodami (chemická a enzymatická), které byly navrženy a optimalizovány ve vědecké práci [1], zabývající se studiem penetrace kapalných huminových látek skrze rostlinné kutikuly. Využití obou metod izolace mělo sloužit k vzájemnému porovnání experimentů, avšak bylo zjištěno, že metody ovlivňují výsledné vlastnosti izolovaných kutikul a tedy mají vliv na transportní experimenty.

Pro studium byly využity kutikuly listů rostliny *Prunus laurocerasus* (česky Bobkovišeň lékařská) (Obr. 19). Stejně jako způsob separace kutikul, byly listy vybrány na základě dřívějších kladných zkušeností s jejich vlastnostmi. Listy jsou tvrdé, silné a jejich kutikuly mají vynikající mechanické vlastnosti. Stáří listů by se mohlo negativně odrazit na výsledcích

měření, proto pro získání kutikul s co nejlepšími vlastnostmi byly sbírány mladé, světlé a nepoškozené listy.



Obr. 19 Detail listu rostliny *Prunus laurocerasus* [36].

Před samotnou izolací byly listy omyty v destilované vodě, aby byly zbaveny nežádoucího prachu, případně dalších nežádoucích látek. Následně byly všechny listy zbaveny řapíku, okrajů listů a poškozených částí na spodní straně listu. V dalším kroku byly kladeny do skleněných nádob (Obr. 20), Poté následovala izolace kutikul dvěma metodami popsány v kapitolách 5.3.1 a 5.3.2.

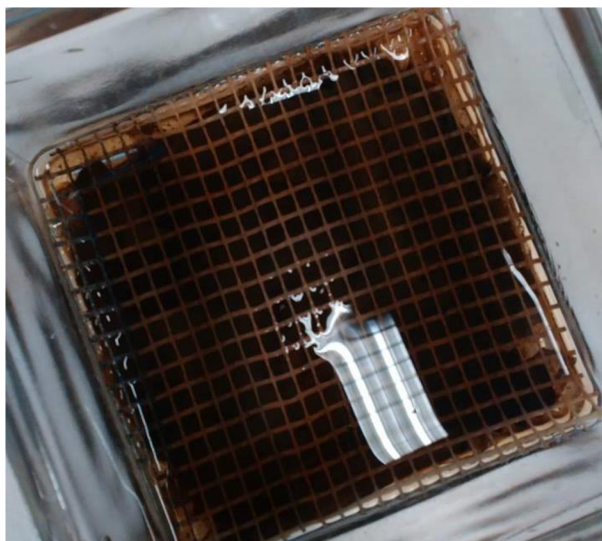


Obr. 20 Omyté listy připravené k izolaci.

5.3.1 Enzymatická metoda separace kutikul

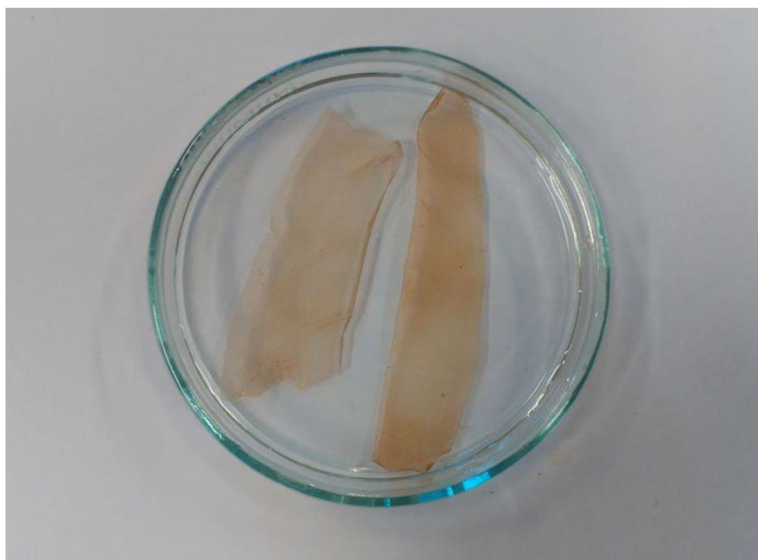
Pro enzymatickou metodu izolace (EMI) bylo použito 20 listů. Byl připraven citrátový pufr o koncentraci 0,1 M a pH v rozmezí 3,5 – 4,5. V připraveném pufru bylo rozpuštěno 5 hm. % pektinázy a 5 hm. % celulózy. Do připraveného izolačního roztoku bylo přidáno 10 obj. % 0,8 M azidu sodného, aby bylo zamezeno vzniku nežádoucích mikroorganismů. Tento roztok

byl převeden na připravené listy. Pro dokonalé pokrytí listů roztokem a zamezení jejich vyplavení byly listy přichyceny umělohmotnou sítkou (Obr. 21). Takto připravená nádoba byla přikryta parafilmem pro zamezení odpařování roztoku ze směsi. Enzymatická izolace rostlinných kutikul trvala přibližně 6 týdnů.



Obr. 21 *Izolační roztok s rostlinnými kutikulami.*

Po uplynutí požadované doby na izolaci byly kutikuly přeneseny do nádoby s destilovanou vodou, degradovaný mezofyl byl z listů jemně odstraněn pinzetou a štětcem. S kutikulami bylo zacházeno opatrně, aby nedošlo k jejich mechanickému poškození. Světle hnědé čiré membrány (Obr. 22) byly tak připraveny pro rozdělení na horní a spodní kutikuly na optickém mikroskopu a pro studium interakce s lignohumátem draselným.

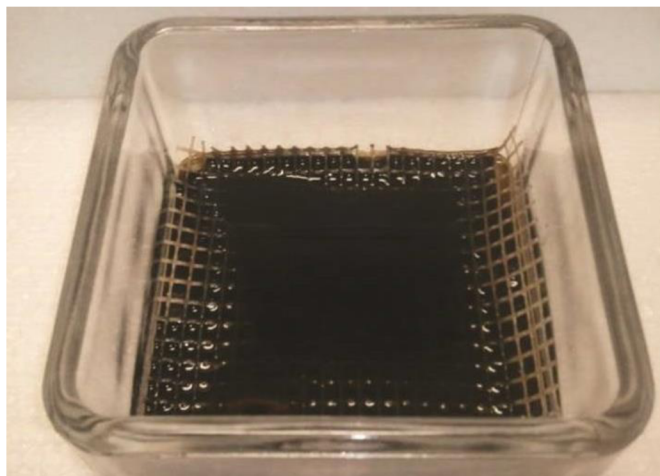


Obr. 22 *Pohled na očištěné kutikuly izolované enzymatickou metodou.*

5.3.2 Chemická metoda separace kutikul

Pro chemickou metodu izolace (CHMI) bylo použito 10 listů. Nachystané listy byly ponořeny do roztoku 60 hm. % chloridu zinečnatého ($ZnCl_2$) v koncentrované kyselině chlorovodíkové (HCl). Při rozpuštění chloridu zinečnatého bylo třeba dbát zvýšené opatrnosti, protože

se jedná o reakci silně exotermického charakteru. Listy byly upevněny umělohmotnou sítčkou (Obr. 23) a odpaření roztoku z nádoby bylo opět chráněno parafilmem.



Obr. 23 Izolační roztok s listy před separací [1].

Chemická izolace trvala 3 dny. Po uplynutí požadované doby byla opatrně vyjmuta umělohmotná síťka a jednotlivé listy byly separovány obdobným způsobem, jako tomu bylo v případě EMI. Byly odstraněny odumřelé zbytky mezofylu a očištěné kutikuly byly připraveny pro optickou mikroskopii a isotermální mikrokolorimetrii (Obr. 24).



Obr. 24 Pohled na kutikuly izolované chemickou metodou.

5.4 Příprava vzorků kutikul pro optickou mikroskopii

Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.2.3, list je pokryt tenkou listovou bariérou ze spodní i horní strany. Tyto kutikuly se od sebe liší svojí strukturou, hlavním rozdílem je přítomnost stomat na spodní kutikule. Kutikuly byly proto separovány dle svých struktur (na spodní respektive na horní), k tomu bylo využito optické mikroskopie.

Očištěné kutikuly byly pokládány na podložní mikrosklíčka a byly volně usušeny na vzduchu po dobu minimálně 24 hodin (Obr. 25).



Obr. 25 Horní kutikula izolovaná chemickou metodou připravená na optickou mikroskopii.

5.5 Příprava vzorků pro isothermální mikrokalorimetrii

Pro studium interakce listových membrána s lignohumátem draselným bylo využito isothermální mikrokalorimetrie. Metoda byla blíže popsána v kapitole 3.4.1 a jeho využívání ve vědecké sféře v kapitole 4.4.

Příprava vzorků spočívala ve vkládání očištěných rostlinných kutikul do 4 ml skleněných ampulí tak, aby se svými hmotnostmi vzájemně příliš nelišily. Ke každé kutikule bylo kapátkem přidáno 10 kapek 1 hm. % roztoku Lignohumátu. Takto připravené vzorky byly uzavřeny teflonovým víčkem, aby nedocházelo k vypařování vodného roztoku. Hmotnosti kutikul a Lignohumátu byly váženy na analytických vahách. Měření probíhalo při dvou konstantních teplotách, 25 °C a 35 °C.

Isothermální mikrokalorimetrii byly podrobeny vzorky 1 hm. % roztoku lignohumátu draselného a samotných rostlinných kutikul s minimálním množstvím čisté vody. Do skleněných ampulí bylo odváženo vždy stejné množství roztoku a byly uzavřeny víčkem. Rovněž tak byly připraveny ampule s čistými kutikulami a byly opět uzavřeny. Tyto vzorky byly podrobeny experimentálnímu měření při teplotě 25 a 35 °C.

5.6 Příprava vzorků pro termogravimetrickou analýzu

Pro studium sorpce lignohumátu draselného na listové bariéry byla zvolena metoda termogravimetrické analýzy. Touto metodou bylo možné zjistit rozdíly v množství popela pro čisté kutikuly a kutikuly s Lignohumátem a posoudit tak, zda kutikuly na sebe látku sorbují či nikoli.

Jednotlivé kutikuly byly opět očištěny dle postupu uvedeného v kapitole 5.3. Rostlinné kutikuly byly vloženy do roztoku 1 hm. % lignohumátu draselného po dobu 3 týdnů. Po uplynutí této doby byly kutikuly opláchnuty destilovanou vodou a poté byly rozprostřeny na Petriho misku (viz Obr. 26) a byly usušeny v sušárně při 30 °C .



Obr. 26 Vzorky kutikul připravené pro sušení pro metodu TGA.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Charakterizace rostlinných kutikul optickým mikroskopem

K rozpoznání abaxiální a adaxiální kutikuly byl použit optický mikroskop Nikon Eclipse e200 a díky softwaru uEyeCockpit byly pořízeny snímky jednotlivých vzorků. Při měření byl použit objektiv s 60-ti násobným zvětšením. Tento mikroskop byl použit pro rychlé rozpoznání vzorků.

Pro zachycení jednotlivých kutikul byl použit optický mikroskop Olympus BX50 s přídatným světelným zdrojem a s digitálním fotoaparátem Olympus Camedia C – 4040Zoom (Obr. 27). Tento typ mikroskopu má mnohem citlivější kameru, tedy snímky jsou mnohem kvalitnější.

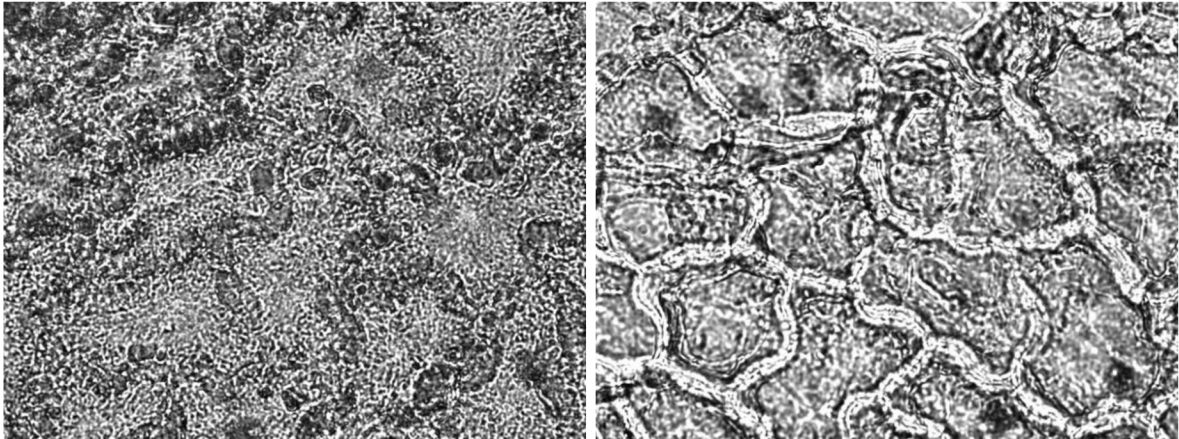


Obr. 27 Optický mikroskop Olympus BX50.

Přípravené vzorky rostlinných kutikul byly proměřeny při 60-ti násobném zvětšení. Na snímcích jsou viditelné rozdíly mezi oběma druhy kutikul. Spodní kutikuly jsou tvořeny pletivem a hlavně viditelnými kruhovitými útvary s otvory, stomata. Naopak horní kutikuly jsou tvořeny pouze pletivovou sítí.

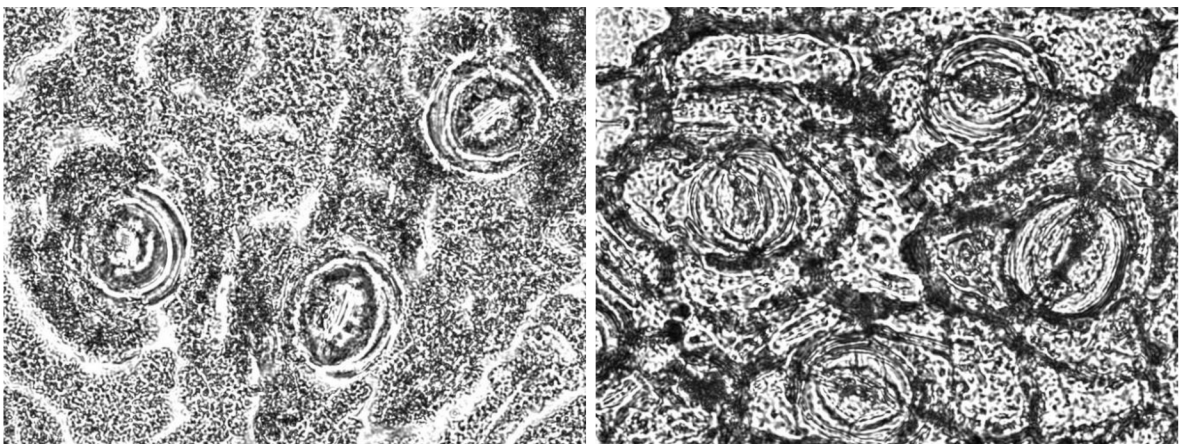
U vzorků kutikul bylo rovněž provedeno porovnání mezi chemicky a enzymaticky izolovanými kutikulami. Z optického mikroskopu jsme se snažily o zjištění významnějších rozdílů ve strukturách kutikul izolovaných různými metodami. Na Obr. 28 jsou znázorněny horní kutikuly izolované enzymatickou (vlevo) a chemickou metodou (vpravo). U obou typů

jsou zřejmé pletivové sítě, tedy struktura obou kutikul je shodná, rovněž se u obou kutikul vyskytují menší tmavá místa, což jsou zbytky neodstraněného mezofylu. Při pohledu na oba snímky je patrné, že kutikuly izolované enzymatickou metodou se nejeví tak kompaktní, jako je tomu v případě chemicky izolovaných kutikul, u nichž je struktura a rysy rostlinné tkáně mnohem zjevnější.



Obr. 28 Horní kutikula izolovaná enzymaticky (vlevo) a horní kutikula izolovaná chemicky (vpravo).

Na Obr. 29 jsou znázorněny snímky spodních stran kutikul opět izolované oběma způsoby. Ze snímku jsou již patrné rozdíly od horních stran kutikul, neboť spodní kutikuly obsahují již tolikrát zmiňované průduchy. Ty jsou přítomny v obou případech kutikul. Ovšem opět z hlediska struktury jsou na enzymatické kutikule (Obr. 29 – vlevo) viditelné malé nekomplexní částičky a nekompaktní pletivová síť. Čímž se kutikula odlišuje od chemicky izolovaných kutikul (Obr. 29 – vpravo).



Obr. 29 Spodní kutikula izolovaná enzymaticky (vlevo) a spodní kutikula izolovaná chemicky (vpravo).

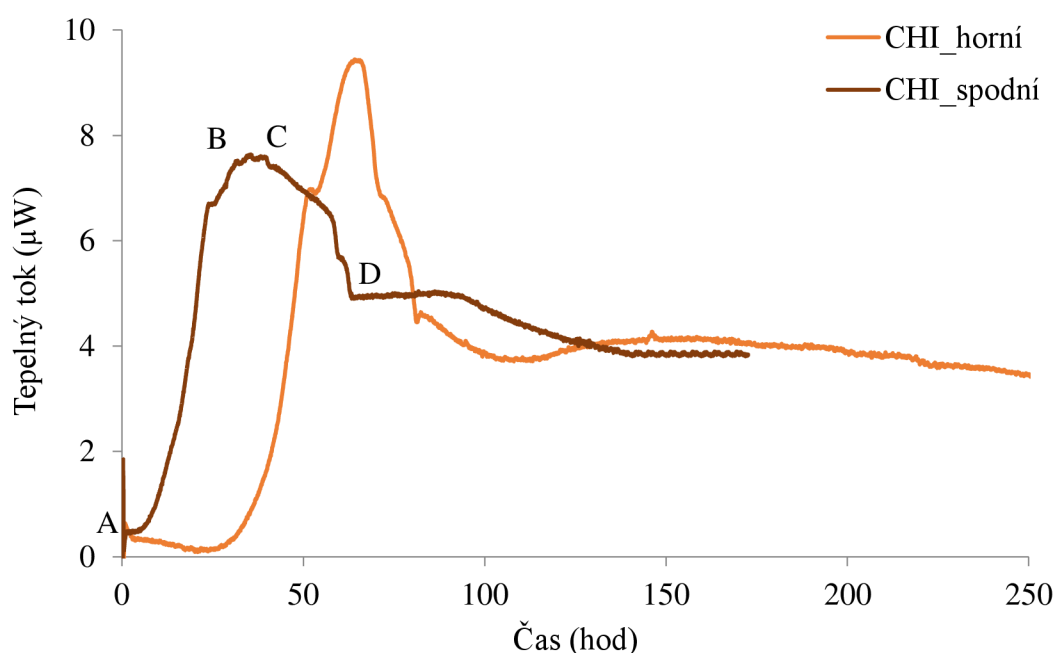
Optický mikroskop je vhodnou metodou pro rozdělení membrán na horní respektive spodní stranu. Dále je z mikroskopických snímků patrná určitá strukturní odlišnost, avšak není tolik průkazná. Tyto pochybnosti by mohly být do budoucna vyvráceny rastrovací elektronovou mikroskopií.

6.2 Souhrn měření sorpce pomocí mikrokolorimetrie

Experimenty interakce rostlinných kutikul s 1 hm. % lignohumátem draselným byly prováděny pomocí mikrokolorimetru TAM III s 6 kanály (Obr. 13). Průběh sorpce byl sledován zvláště na horních a spodních kutikulách, izolovaných enzymaticky nebo chemicky.

Z dosažených grafů a dat bylo zjištěno, že Lignohumát s rostlinnými kutikulami nějakým způsobem reaguje, a to velmi obdobným způsobem, který byl pozorován ve člancích uvedených v kapitole 4.4. Ačkoli se v těchto případech jednalo o studium mikrobiální aktivity, metabolismu bakterií či buněk nebo se studovala toxicita látek na živých organismech apod., průběh námi provedených experimentů vedly k podobným výsledkům. Na základě těchto zkušeností byla tedy odvozena určitá analogie, která byla aplikovaná na naše experimenty.

Z naměřených dat byly sestaveny grafy závislosti tepelného toku respektive výkonu na čase (Obr. 30). Ze záznamu termodynamického průběhu bylo potvrzeno, že 1 hm. % Lignohumát interaguje s listovými kutikulami a z naměřených průběhů bylo rovněž zjištěno, že termodynamický průběh závisí od metody izolace kutikul (Obr. 32) a od typu kutikuly (horní respektive spodní) (Obr. 30 a Obr. 31). Rovněž se potvrdilo, že na průběh děje má vliv i teplota, při které experiment probíhá (Obr. 34).

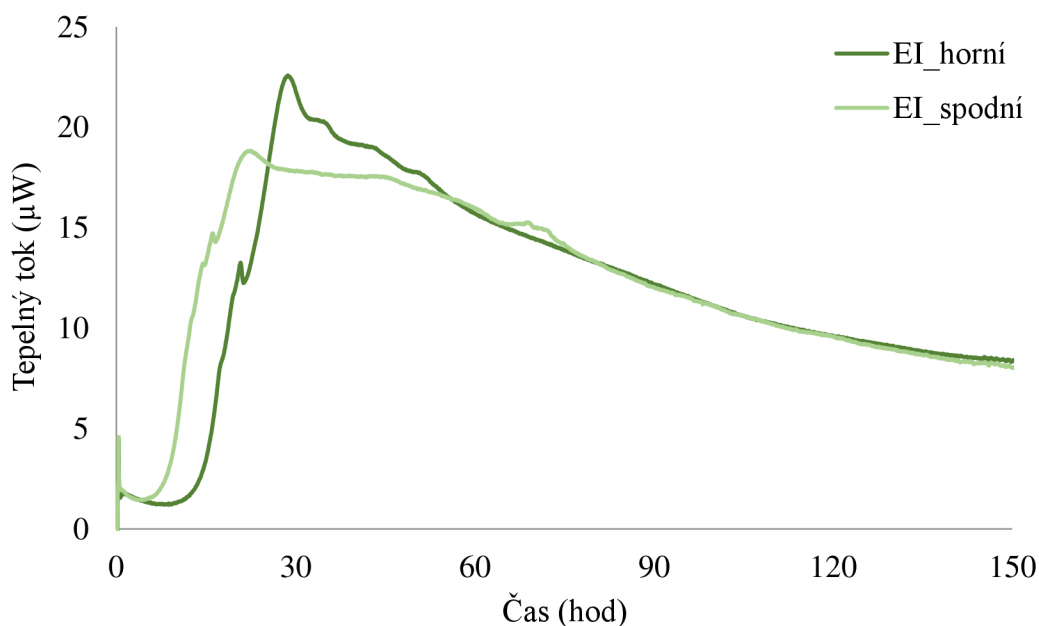


Obr. 30 Porovnání tepelných toků pro chemicky izolované kutikuly v roztoku 1% lignohumátu draselném při 25 °C.

Na základě vypracované rešerše v kap. 4.4.1 byl popsán průběh dat na Obr. 30. Část A je začátek měření, bez záznamu reakce, část A – B znázorňuje exponenciální fázi následovanou částí B – C, která znázorňuje fázi stacionární a po ní fázi C – D, která znázorňuje klesající fázi a termodynamické ustálení systému, tudíž konec experimentu.

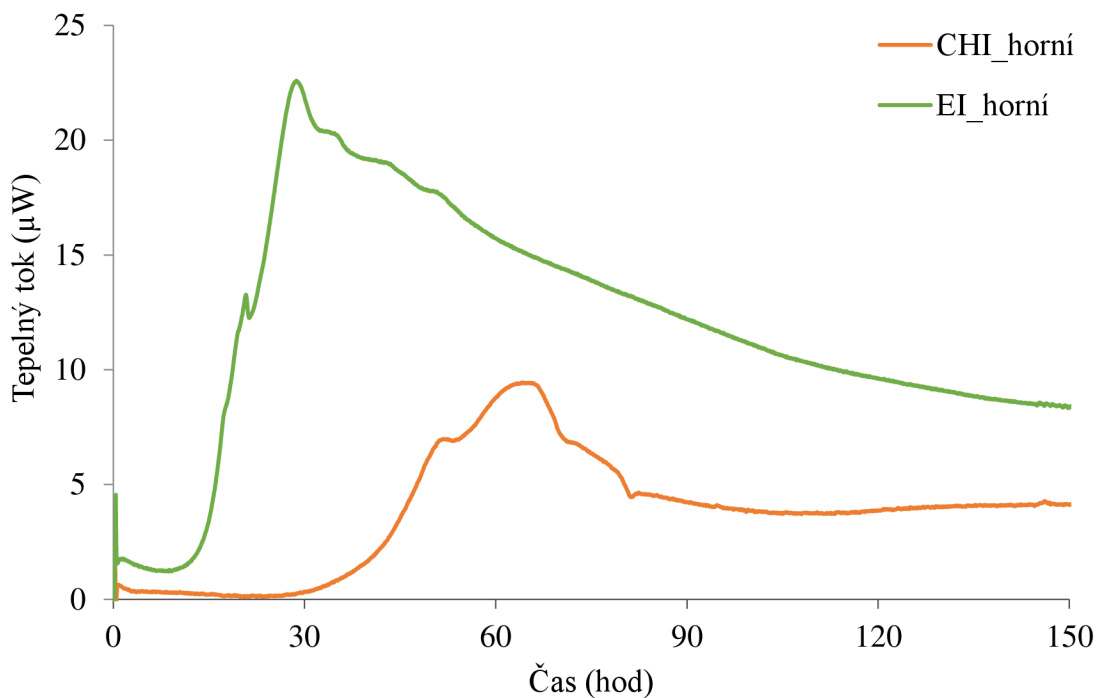
Pro spodní kutikulu je patrné, že vznik stacionární fáze, tedy předpokládané sorpce nastává mnohem rychleji, již po 36 hodinách, v porovnání s horní kutikulou, jejíž stacionární fáze dosahuje maxima v 63,5 hodině. Posun píku spodní kutikuly vůči horní je v rozmezí 27,5 hodiny. Z uvedeného grafu si můžeme rovněž povšimnout, že spodní kutikula dosahuje menších tepelných toků než horní kutikula (Tab. 3).

Vzniklý pík značí zvýšený tepelný tok, tedy změnu termodynamického systému, což v našich experimentech může znamenat sorpci respektive interakci lignohumátu draselného na kutikulu.



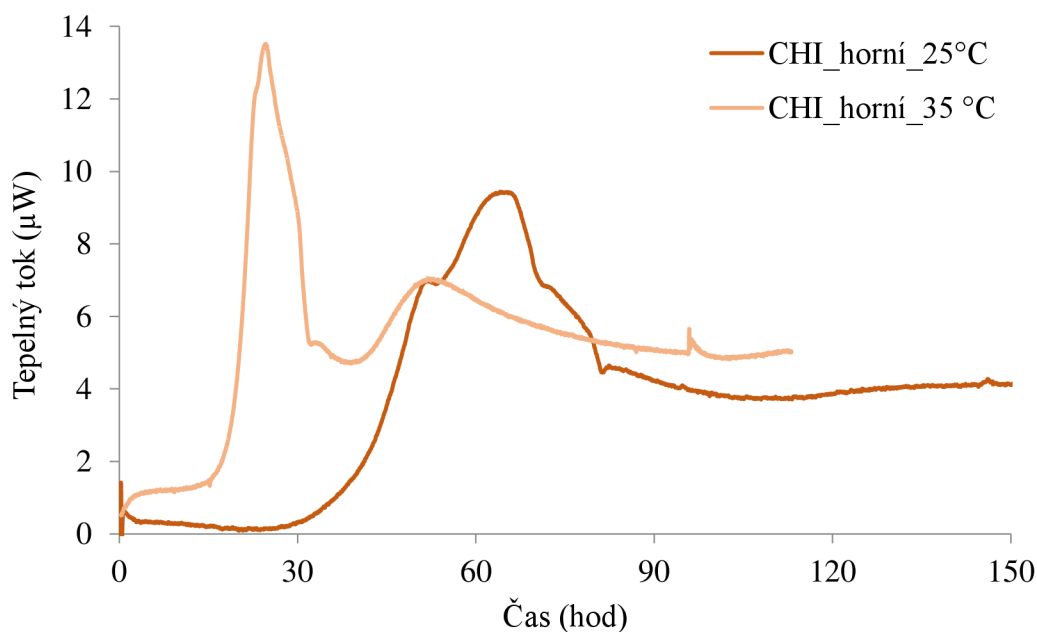
Obr. 31 Porovnání tepelných toků enzymaticky izolovaných kutikul v 1% lignohumátu draselném při 25 °C.

Na Obr. 31 je vidět podobný průběh děje, který byl pozorován i pro případ chemicky izolovaných kutikul. Opět je zde přítomna určitá exponenciální, stacionární a pak klesající funkce, které celý termodynamický proces popisují. Opět zde můžeme pozorovat posun píku horní kutikuly vůči spodní kutikule, což bylo pozorovatelné i pro chemicky izolované kutikuly. Rozdílem je ovšem posun těchto píků ke kratším časům. Maximum tepelného toku pro spodní kutikulu vzniklo po 20 hodinách a pro horní kutikulu po 27 hodinách. Rovněž zde můžeme pozorovat rozdíly v dosažených hodnotách maxim tepelného toku pro spodní kutikulu, jehož hodnota dosahovala 18 µW a pro horní kutikulu, která dosahovala hodnoty 22 µW. Maxima obou tepelných toků byla dosažena s časovým rozestupem asi dvou hodin.



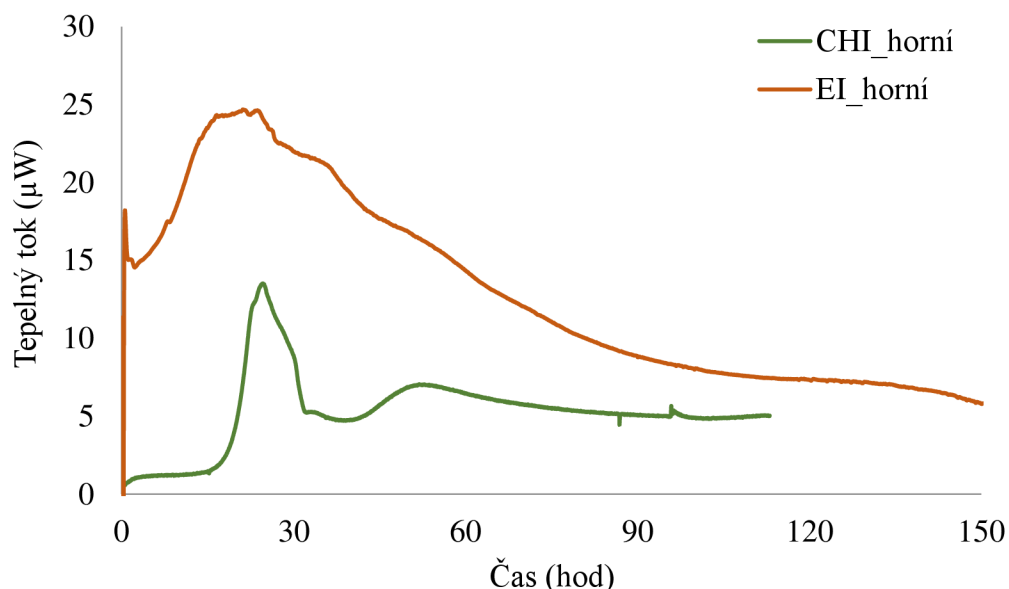
Obr. 32 Porovnání tepelných toků kutikul z horní strany listu izolovaných chemickou a enzymatickou metodou pro 25 °C.

Graf na Obr. 32 srovnává naměřené tepelné toky při 25 °C pro horní kutikuly izolované chemicky a enzymaticky. Z grafu je jednoznačně vidět, že enzymaticky izolované kutikuly dosahují vyšších hodnot tepelných toků než chemicky izolované kutikuly. Hlavně u enzymaticky izolovaných kutikul bylo dosaženo kratších časů vzniku píku než u chemicky izolovaných kutikul, z čehož se můžeme domnívat, že tyto kutikuly rychleji interagují s lignohumátem draselným.



Obr. 33 Porovnání chemicky izolovaných kutikul z horní strany listu pro experimenty při 25 °C a 35 °C.

Obr. 33 znázorňuje rychlejší odezvu sorpce lignohumátu draselného na horní kutikulu izolovanou chemickou metodou při teplotě měření 35 °C než pro horní kutikulu izolovanou stejnou metodou a měřenou při 25 °C. Tento experiment se pro nás stal cennou informací v oblasti transportních experimentů, neboť experimenty probíhající při 35 °C, ať už pro enzymaticky nebo chemicky izolované kutikuly dosahují vzniku píku při velmi malých odchylkách časů (Obr. 34). Z toho lze usoudit, že transportní experimenty budou co nejméně ovlivněny sorpčními procesy.



Obr. 34 Porovnání horních kutikul izolovaných chemicky a enzymaticky při 35 °C.

Abychom se ujistily, že vznik píku není zapříčiněn jen samotným roztokem lignohumátu draselného či jen samotnými kutikulami, byly isotermální mikrokalorimetrii podrobeny vzorky 1 hm. % roztoku Lignohumátu a kutikul. Postup přípravy je popsán v kapitole 5.5. Z naměřených dat bylo zřejmé, že samotný roztok lignohumátu draselného se chová jako stabilní vodný roztok, neboť nedochází ke vzniku žádného píku v čase. Můžeme tedy tvrdit, že u 1 hm. % roztok lignohumátu draselného nedochází k žádným degradačním procesům ani vzniku nežádoucích mikroorganismů, které by ovlivňovaly termodynamický děj uvnitř ampulí v měřeném experimentu.

Stoprocentní jistoty bylo dosaženo po změření 1 hm. % roztoku lignohumátu sodného s obsahem azidu sodného, který je běžně využíván jako dezinfekční činidlo, tudíž k zamezení růstu mikroorganismů. Z křivky uvedené v kapitole 10.1 je zřejmé, že ani tento vzorek nepodléhá žádným výše zmíněným dějům, z čehož plyne, že 1 hm. % lignohumát draselný v měřeném čase je stabilní a vhodný pro zvolené experimenty sorpce lignohumátu draselného na listové membrány.

Tab. 3 Průměrné hodnoty časů a maxim tepelných toků pro vzorky kutikul izolovaných EMI a CHMI měřených metodou mikrokalorimetrie při 25 a 35 °C.

	teplota	kutikula	čas (hod)	tepelný tok (μW)
EMI	25 °C	horní	28,5 ± 0,1	22,4 ± 0,1
		spodní	24,0 ± 0,2	18,2 ± 0,1
	35 °C	horní	21,5 ± 0,1	24,5 ± 0,2
		spodní	19,0 ± 0,1	27,9 ± 0,3
CHMI	25 °C	horní	64,2 ± 0,3	9,4 ± 0,1
		spodní	35,1 ± 0,2	7,5 ± 0,1
	35 °C	horní	25,0 ± 0,2	13,3 ± 0,2
		spodní	9,2 ± 0,1	18,5 ± 0,1

V tabulce (Tab. 3) jsou uvedeny hodnoty pro čas vzniku maxim tepelných toků a hodnoty maxim tepelného toku pro všechny měřené vzorky kutikul (horní i spodní) izolované enzymatickou i chemickou metodou při 25 a 35 °C.

Při srovnání vzorků chemicky a enzymaticky izolovaných kutikul, je zřejmé, že na enzymaticky izolované kutikuly se Lignohumát sorboval rychleji, než u chemicky izolovaných kutikul.

Z uvedené tabulky lze rovněž vyvodit, že za vyšší teploty (35 °C) probíhala sorpce mnohem rychleji a při srovnání poloh piků pro horní a spodní kutikulu je patrné, že nedocházelo k časovým posunům probíhajících dějů, jako tomu bylo v případě experimentů při 25 °C. Příkladem jsou enzymaticky izolované kutikuly, u nichž je zřejmé, že při 35 °C dochází téměř ve stejnou dobu ke vzniku stacionární fáze piků.

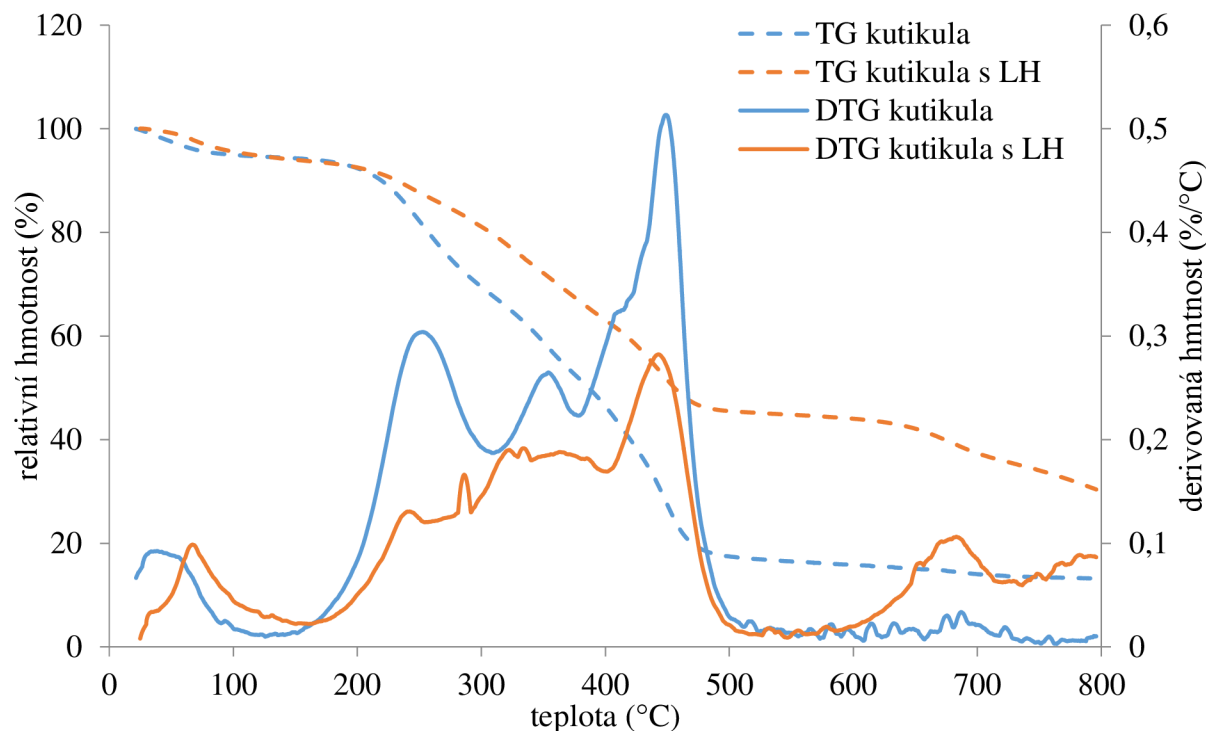
Této informace může být využito v oblasti studia transportních procesů, protože teplota 35 °C se jeví jako mnohem vhodnější pro měření difúzních experimentů než teplota 25 °C, neboť při této teplotě bude dosaženo podmínek minimálně ovlivňujících průběh penetrace lignohumátu draselného. Navíc bylo zjištěno, že při teplotě 35 °C maxima tepelných toků dosahovaly vyšších hodnot, než při teplotě 25 °C. Tato informace bude hrát významnou roli v množství nasorbovaného Lignohumátu na rostlinné kutikuly, ovšem to bude dalším předmětem výzkumu.

Grafy všech naměřených vzorků z isothermální mikrokalorimetrie jsou uvedeny v příloze (kapitola 10.1)

6.3 Souhrn měření sorpce pomocí termogravimetrické analýzy

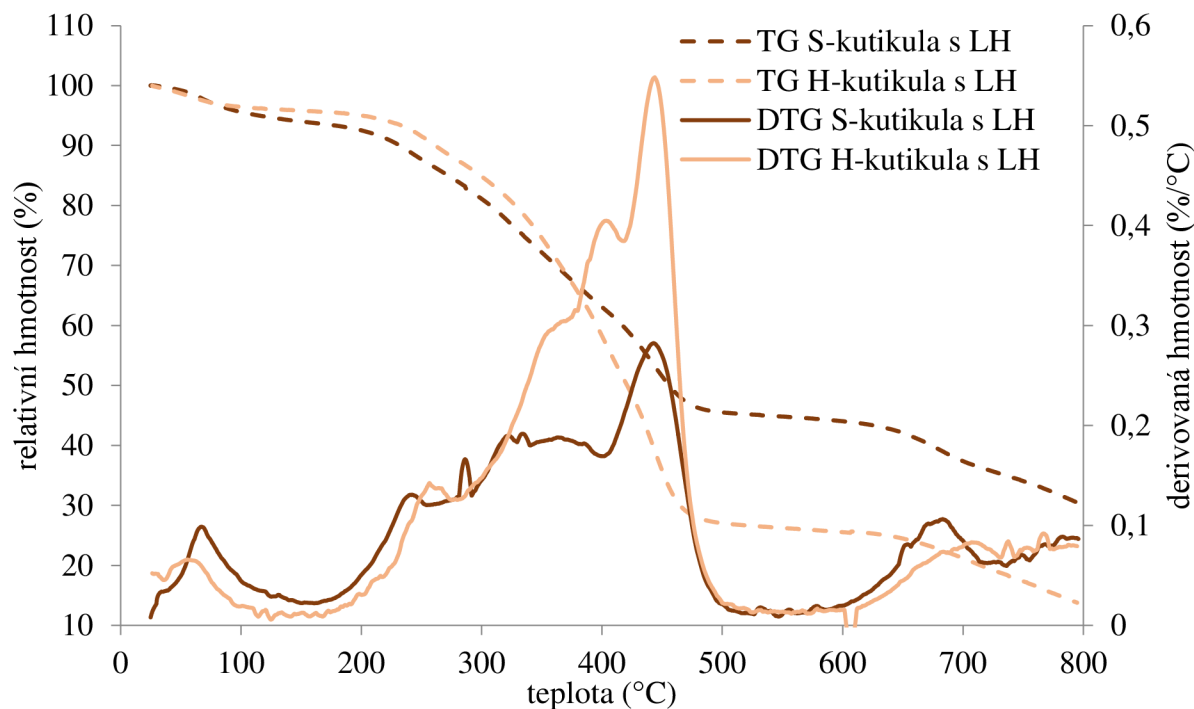
Termogravimetrická analýza (TGA) byla použita pro měření vzorků kutikul z horní i spodní strany listu izolovaných chemickou i enzymatickou metodou. Vzorky byly ohřívány v proudu inertního plynu, dusíku.

Naměřená data byla proložena dvěma typy křivek, tj. termogravimetrické křivky (TG), znázorňující relativní hmotnost v procentech, a derivační křivky (DTG), které charakterizují derivované hmotnosti neboli procentuální úbytek hmotnosti v závislosti na teplotě.



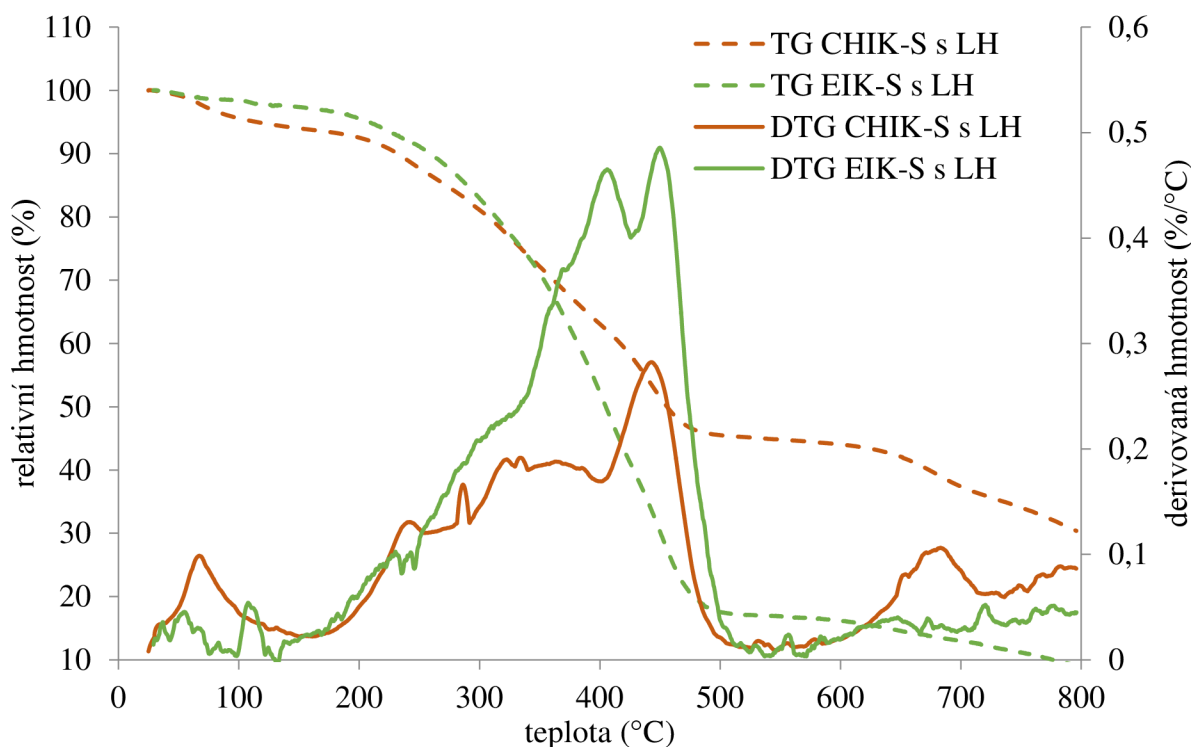
Obr. 35 Závislost úbytku hmotností spodních chemicky izolovaných kutikul na teplotě. Modře je znázorněn vzorek čistých listových membrán a oranžové křivky znázorňují vzorky kutikul máčených v 1 hm. % lignohumátu draselném.

Na Obr. 35 jsou zachyceny TG a DTG křivky pro vzorky spodních chemicky izolovaných. Důležitý výsledek měření je zachycen DTG křivkami v oblasti teplot 600 – 700 °C. V této oblasti došlo ke zvýšení křivky pro derivovanou hmotnost vzorku s lignohumátem draselným oproti vzorku čisté kutikuly. Tento pík s největší pravděpodobností zachycuje sorpci lignohumátu draselného na kutikule. Stejně tak TG křivka kutikuly s Lignohumátem znázorňuje vyšší relativní hmotnost, což znamená větší procentuální zastoupení popela u měřeného vzorku.



Obr. 36 Závislost úbytku hmotnosti horních a spodních chemicky izolovaných kutikul máčených v 1 hm.% lignohumátu draselném. Oranžové křivky znázorňují termogravimetrický průběh horní kutikuly a hnědé kutikuly spodní.

Porovnání sorpce lignohumátu draselného na spodní a horní kutikulu znázorňuje graf (Obr. 36) závislosti úbytku hmotnosti na teplotě. Z naměřených dat můžeme vidět určitou analogii mezi měřeními vzorky horní a spodní kutikuly, ovšem nemůžeme v tomto případě se stoprocentní jistotou usoudit, že by horní či spodní kutikula více sorbovala lignohumát draselný než kutikula horní.



Obr. 37 Závislost úbytku hmotností chemicky a enzymaticky izolovaných kutikul ze spodní strany listu. Zeleně jsou znázorněny chemicky izolované kutikuly a hnědě enzymaticky izolované kutikuly.

Pro porovnání množství sorbovaného 1 hm. % lignohumátu draselného na rostlinné kutikuly izolované chemicky a enzymaticky byl sestaven graf (Obr. 37) závislosti úbytku hmotností na teplotě. Průběh termodynamického procesu pro kutikuly izolované chemicky i enzymaticky si jsou velice podobné, jediný rozdíl můžeme sledovat v rozmezí 700 – 800 °C, kde dochází k rozdílům v relativních hmotnostech popela, z čehož bychom mohli usuzovat na větší sorpci 1 hm. % lignohumátu pro chemicky izolované kutikuly.

Tab. 4 Naměřené hodnoty relativní hmotností vzorků při nejvyšší teplotě

kutikula	CHMI		EMI	
	spodní	horní	spodní	horní
bez LH (%)	13,2	8,1	0,007	0,02
s LH (%)	30,4	13,7	9,1	6,3

Pro porovnání měření jednotlivých vzorků byly konečné hodnoty relativních hmotností (udávané v %) zapsány do tabulky (Tab. 4, ze které lze vyčíst, že při měření vzorků s obsahem Lignohumátu vznikalo v porovnání s měřením čistých kutikul více popela. Grafy, sloužící k dalšímu srovnání sorpce mezi jednotlivými vzorky, jsou doloženy v příloze (kapitola 10.2).

Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že kutikuly máčené v 1 hm. % roztoku lignohumátu sodného dosahují vyšších hodnot popela, z čehož bychom mohly usuzovat na jeho sorpci na rostlinné kutikuly. Z tabulky (Tab. 4) můžeme vyčíst, že množství popela

bylo zvýšeno jak pro CHMI, tak EMI a že mnohem vyšších hodnot bylo dosaženo u chemicky izolovaných kutikul. Na vzdory výsledkům z TGA analýzy nemůžeme jednoznačně říci, že dochází k sorpci lignohumátu draselného a nezískaly jsme tak data pro volné částice Lignohumátu utkvělého na povrchu kutikul. Z těchto důvodů bude nutné experimenty zopakovat, lépe analyzovat, případně využít jiných dostupných technik.

7 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo sepsání rešerše na téma sorpce respektive interakce lignohumátu draselného s rostlinnými kutikulami. V rámci rešerše byla zpracována kapitola věnující se současnými možnými fyzikálně-chemickými metodami, kterými se dá průběh sorpce stanovit. Pro vypracování bakalářské práce bylo využito metody isothermální mikrokolorimetrie a termogravimetrické analýzy, dostupné na Fakultě chemické, Vysokého učení technického v Brně.

K průzkumu sorpce byly využity kutikuly, které byly předem izolovány dvěma již osvědčenými metodami (enzymatickou a chemickou metodou). Poté byly kutikuly rozděleny optickým mikroskopem na svrchní a spodní, které byly využity pro jednotlivá měření. Cílem měření bylo dokázat rozdíl sorpce Lignohumátu na kutikulách odlišující se svými vlastnostmi, což je důsledek rozdílných izolačních metod, kterými jsou membrány získávány. Vzájemně byly porovnávány také výsledky měření sorpce pro kutikuly ze spodní a horní strany listu.

Z výsledků isothermální mikrokolorimetrie bylo zjištěno, že enzymaticky izolované kutikuly mnohem rychleji interagují, respektive sorbují lignohumát draselný než kutikuly získávané CHMI. Tím byly potvrzeny experimenty Ing. Marcely Laštůvkové, která stanovila, že kutikuly izolované enzymatickou metodou mnohem lépe penetrují lignohumát draselný než chemicky izolované kutikuly. Rovněž bylo touto metodou ověřeno, že lepší penetrace bude probíhat pro spodní kutikuly než pro kutikuly horní, což opět korelovalo s výsledky diplomové práce.

U metody TGA bylo na základě množství popela potvrzeno, že spodní kutikuly na sebe sorbují více lignohumátu draselného než kutikuly horní. Avšak naprosto se tato metoda rozcházela s výsledky isothermální mikrokolorimetrie při porovnání enzymaticky a chemicky izolovaných kutikul, u níž vyšlo, že chemicky izolované kutikuly více sorbují Lignohumát než enzymaticky izolované kutikuly. Tento rozpor může být vysvětlen tím, že se nejedná o sofistikovanou metodu, která nám nijak blíže nepopíše systém z hlediska vnitřní struktury či vazeb. Jedná se spíš o metodu doplňkovou, a proto bude nezbytné experimenty zopakovat či podrobit dalším měřením a analýzám.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LAŠTŮVKOVÁ, M. *Studium transportu huminových látek skrz rostlinné kutikuly*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 94 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [2] Wallerius, J. G. *Agriculturae fundamenta chemica spez.* Upsala, Sweden 1761.
- [3] De Saussure, T. *Recherches chimiques sur la vegetation*. Paris, France 1804.
- [4] Sprengel, K. *Die Bodenkunde oder die Lehre vom Boden*. Müller, Leipzig 1839.
- [5] Berzelius J.J. *Lehrbuch der Chemie*. Wöhler, Dresden and Leipzig 1839.
- [6] TAN, Kim Howard. *Humic matter in soil and the environment: principles and controversies*. New York: Marcel Dekker, c2003. Books in soils, plants and the environment. ISBN 08-247-4272-9.
- [7] PICCOLO, Alessandro. *The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science* [online]., 57 [cit. 2017-05-18]. DOI: 10.1016/S0065-2113(02)75003-7.
- [8] MIKULÁŠKOVÁ, Barbora, Lubomír Lapčík a Ivan Mašek. Lignit - struktura, vlastnosti a použití. *Chemické listy*[online]. 1996, **1997**(91), 160-168 [cit. 2016-11-08]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/1997_03_160-168.pdf
- [9] M. PENA-MÉNDEZ, Eladia, Josef HAVEL a Jiří PATOČKA. Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of APPLIED BIOMEDICINE* [online]. 2005, **2004**(3), 12 [cit. 2016-11-19]. ISSN 1214-0287. Dostupné z: [https://www.supremefulvic.com/documents/pdf/4.humic.substances.compnds.of.unkwn.structure\(2005\).pdf](https://www.supremefulvic.com/documents/pdf/4.humic.substances.compnds.of.unkwn.structure(2005).pdf)
- [10] Waksman, S. A. (1932) *Humus*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- [11] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 35-273-0230-1.
- [12] Hedges, J. I. (1978) The formation and clay mineral reactions of melanoidins, *Geochim. Cosmochim. Acta* 42, 69-76.
- [13] STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 0-471-59474-1
- [14] PEÑA-MÉNDEZ, Eladia M., Klára NOVOTNÁ, Dagmar GAJDOŠOVÁ, Venerando GONZÁLEZ a Josef HAVEL. Characterization of humic substances of different origin by means of mass spectrometry and neural networks. *Chemosphere* [online]. Elsevier, 2007, **68**(11), 2047-2053 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.02.037. ISSN 00456535.
- [15] PANKRATOV, D. A. a M. M. ANUCHINA. *Role of humic substances in the formation of nanosized particles of iron corrosion products: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science* [online]., 57 [cit. 2017-05-18]. DOI: 10.1134/S0036024417020224. ISBN 10.1134/S0036024417020224.
- [16] JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 8., aktualiz. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2005. ISBN 80-718-2177-2.
- [17] Martin JT, Juniper BE. *The cuticles of plants*. London: Edward Arnold. Juniper BE, Southwo 1970.

- [18]RIEDERER, Markus a Jörg SCHÖNHERR. *Accumulation and transport of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid in plant cuticles: I. Sorption in the cuticular membrane and its components* [online]., 57 [cit. 2017-05-18]. DOI: 10.1016/0147-6513(84)90027-7. ISBN 10.1016/0147-6513(84)90027-7.
- [19]DOMÍNGUEZ, Eva, Jesús CUARTERO a Antonio HEREDIA. *An overview on plant cuticle biomechanics: I. Sorption in the cuticular membrane and its components* [online]., 57 [cit. 2017-05-18]. DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.04.016. ISBN 10.1016/j.plantsci.2011.04.016.
- [20]MOLINA, Isabel. Biosynthesis of plant lipid polyesters. *Plant Lipid Biochemistry* [online]. 26-06-2010 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/polyesters/index.htm>
- [21]HEREDIA, Antonio a Jesús CUARTERO. *Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer: I. Sorption in the cuticular membrane and its components* [online]., 57 [cit. 2017-05-18]. DOI: 10.1016/S0304-4165(02)00510-X. ISBN 10.1016/S0304-4165(02)00510-X.
- [22]TAIZ, Lincoln a Eduardo ZEIGER. *Plant physiology*. Sunderland. MA: Sinauer Associates. 2010. ISBN 9780878938667
- [23]CHO, Seong Ho, Keum Seon JEONG, Sun-Hye KIM a Jae-Hong PAK. *Leaf cuticle micromorphology of Fagus L. (Fagaceae) species: I. Sorption in the cuticular membrane and its components* [online]., 57 [cit. 2017-05-18]. DOI: 10.1016/j.japb.2014.10.002. ISBN 10.1016/j.japb.2014.10.002.
- [24]FAGERIA, N. K., M. P. Barbosa FILHO, A. MOREIRA a C. M. GUIMARÃES. Foliar Fertilization of Crop Plants. *Journal of Plant Nutrition* [online]. Taylor, 2009, **32**(6), 1044-1064 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.1080/01904160902872826. ISSN 01904167.
- [25]ŠKARPA, Petr, Rostislav RICHTER a Pavel RYANT. Mímokořenová výživa je součástí systému hnojení rostlin. *Agromanuál* [online]. 2015, **2015** [cit. 2016-12-22]. Dostupné z: <http://www.agromanual.cz/cz/clanky/vyziva-a-stimulace/listova-hnojiva/mimokorenova-vyziva-je-soucasti-systemu-hnojeni-rostlin>
- [26]Metody termické analýzy. *Centrum materiálového výzkumu* [online]. Brno: Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, c2017 [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <http://www.materials-research.cz/cz/laboratore/laborator-biokoloidu/termicka-analyza-a-kalorimetrie/metody-termicke-analyzy/>
- [27]Termická analýza – termogravimetrie (TGA). *ChemPoint* [online]. Brno: Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, c2017 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/kucerik-1>
- [28]RIEDERER, Markus, Markus BURGHARDT, Sabine MAYER, Hans OBERMEIER a Joerg SCHOENHERR. Sorption of Monodisperse Alcohol Ethoxylates and Their Effects on the Mobility of 2,4-D in Isolated Plant Cuticles: I. Sorption in the cuticular membrane and its components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1995, **43**(4), 1067-1075 [cit. 2017-05-18]. DOI: 10.1021/jf00052a041. ISBN 10.1016/j.japb.2014.10.002. ISSN 0021-8561.

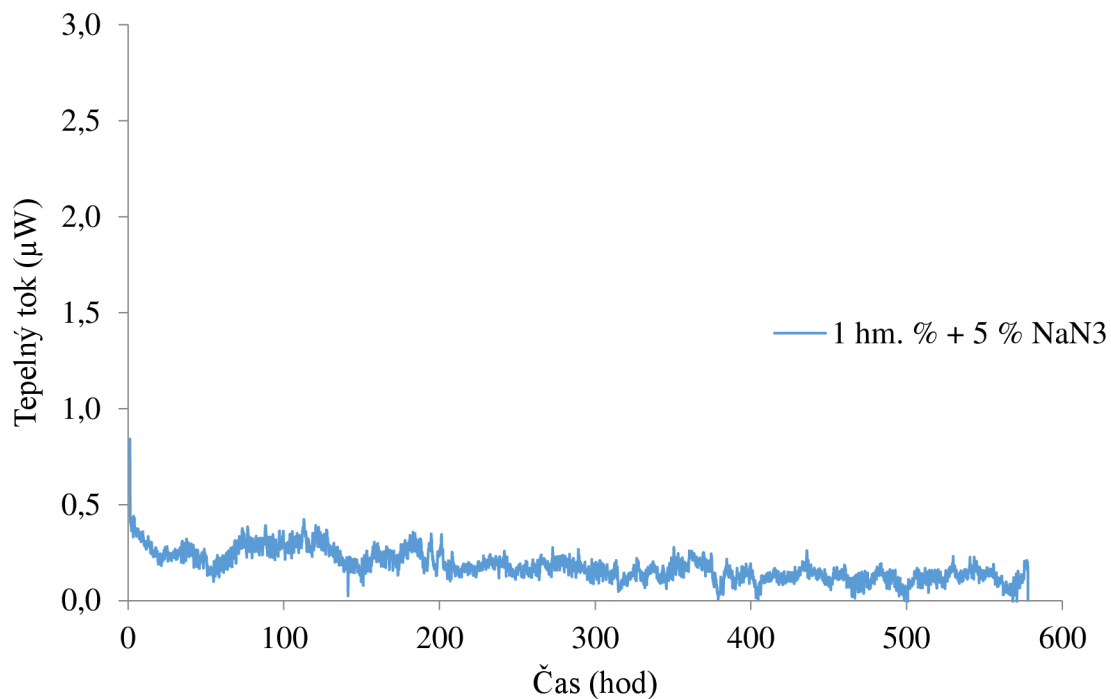
- [29] MERK, S a M RIEDERER. Sorption of volatile C1 to C6 alkanols in plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* [online]. Oxford University Press, 9705, **48**(310), 1095-1104 [cit. 2016-10-31]. ISSN 14602431. Dostupné z: <https://goo.gl/SFDgNp>
- [30] SANTIÉ, Simone a André CHAMEL. Reassessment of the role of cuticular waxes in the transfer of organic molecules through plant cuticles. *Plant Physiology and Biochemistry* [online]. Elsevier Masson SAS, 1998, **36**(3), 225-231 [cit. 2016-10-31]. DOI: 10.1016/S0981-9428(97)86879-9. ISSN 09819428.
- [31] CHEN, Bao-Liang a Yun-Gui LI. Sorption of 1-naphthol by plant cuticular fractions. *Journal of Environmental Sciences* [online]. Elsevier B.V, 2007, **19**(10), 1214-1220 [cit. 2016-10-31]. DOI: 10.1016/S1001-0742(07)60198-3. ISSN 10010742.
- [32] YAN, Dan, Cheng JIN, Xiao-He XIAO, Xiao-Ping DONG a Joerg SCHOENHERR. Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry: I. Sorption in the cuticular membrane and its components. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2008, **70**(6), 845-849 [cit. 2017-05-18]. DOI: 10.1016/j.jbbm.2007.07.009. ISBN 10.1016/j.japb.2014.10.002. ISSN 0165022x.
- [33] ZHENG, Dan, Yi LIU, Yue ZHANG, Xiao-Juan CHEN a Yun-Fen SHEN. Microcalorimetric investigation of the toxic action of Cr(VI) on the metabolism of *Tetrahymena thermophila* BF5 during growth. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2006, **22**(2), 121-127 [cit. 2017-05-17]. DOI: 10.1016/j.etap.2005.12.011.
- [34] KISHI, Hisashi, Mika NEMOTO, Mitsunori ENOMOTO, Motoo SHINODA, Tomomi KAWANOBE a Hisao MATSUI. *Acute toxic effects of dioctyltin on immune system of rats* [online]. [cit. 2017-05-17]. DOI: 10.1016/j.etap.2006.04.007. ISBN 10.1016/j.etap.2006.04.007.
- [35] ZHENG, Shixue, Junli HU, Ke CHEN, Jun YAO, Ziniu YU a Xiangui LIN. Soil microbial activity measured by microcalorimetry in response to long-term fertilization regimes and available phosphorous on heat evolution. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2009, **2009**(41), 2094-2099. [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1016/j.soilbio.2009.07.019. ISBN 10.1016/j.soilbio.2009.07.019. ISSN 0038-0717.
- [36] Bobkovišeň lékařská (*Prunus laurocerasus* L.) In: *Elektronický herbář* [online]. Plzeň: Jaroslav Racek, 2009 [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: http://www.e-herbar.net/main.php?g2_itemId=22048

9 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

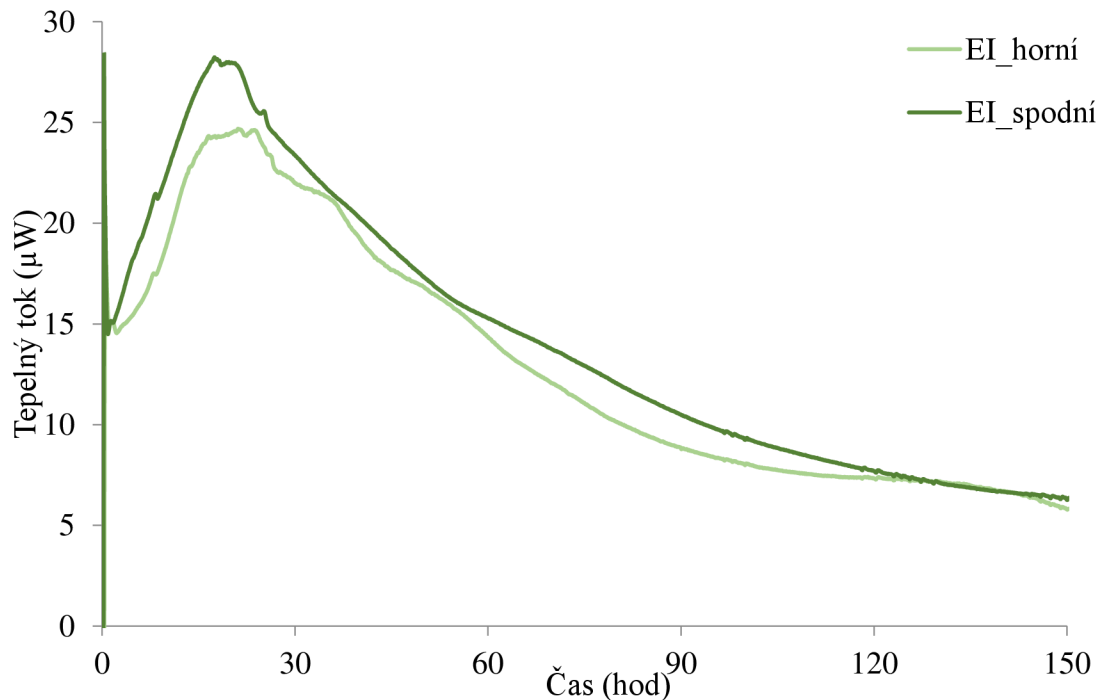
HL	humínové látky
HK	humínové kyseliny
FK	fulvínové kyseliny
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
TGA	termogravimetrická analýza
ITC	izotermická titrační kalorimetrie
EMI	enzymatická metoda izolace
CHMI	chemická metoda izolace
MS	hmotnostní spektrometrie
EI	elektrosprejová ionizace
MALDI-TOF	matricí asistovaná laserová desorpce
LDI-TOF	laserová desorpce
PTV injektor	Programmable Temperature Vaporization (injektor s programovatelnou teplotou odpařování)
FID detektor	plamenoionizační detektor
WCOT	Wall Coated Open Tubular

10 PŘÍLOHA

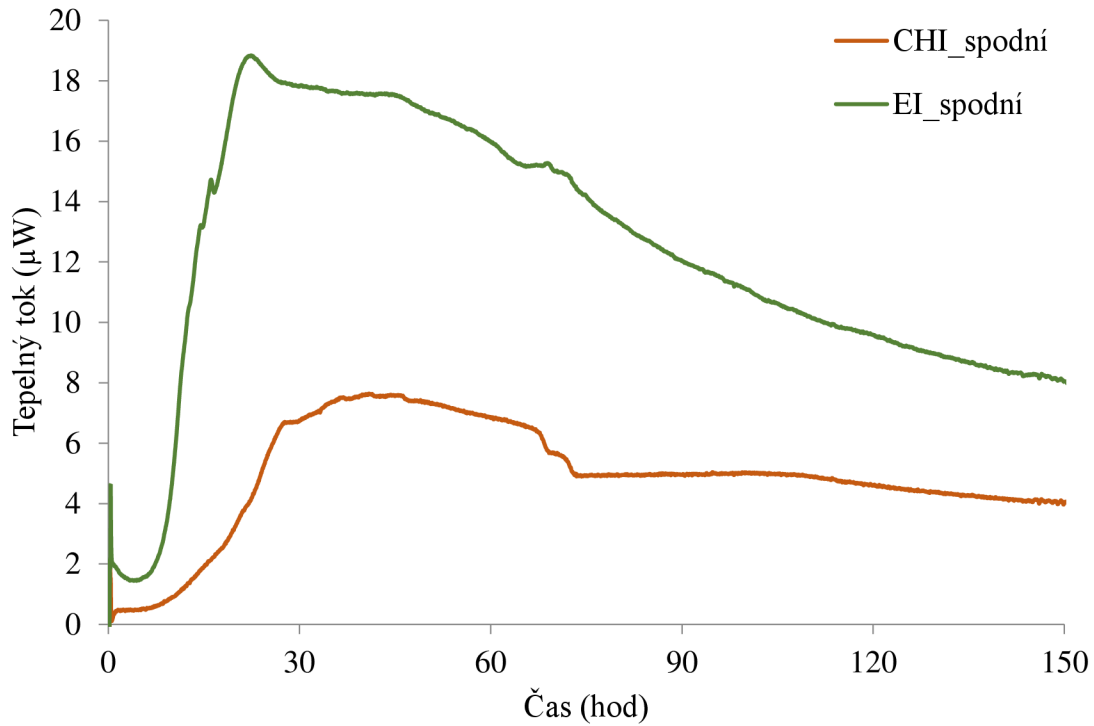
10.1 Grafy měření mikrokalorimetrie



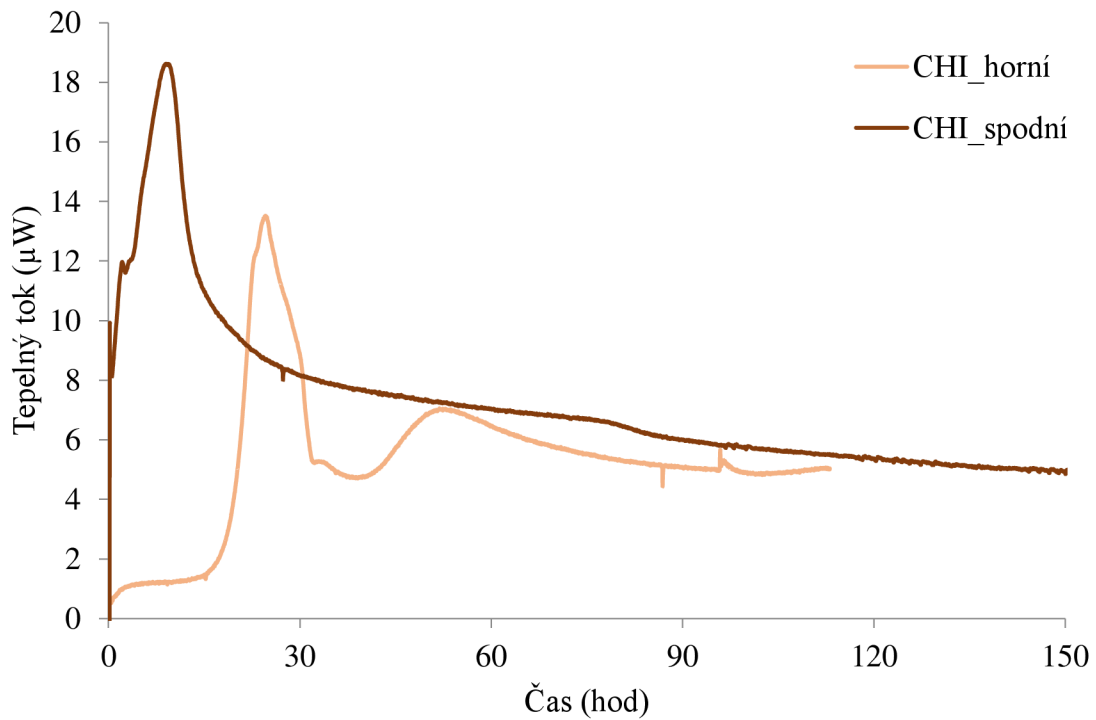
Obr. 38 Tepelný tok měřený ve vzorku 1 hm. % lignohumátu draselného s přidavkem azidu sodného.



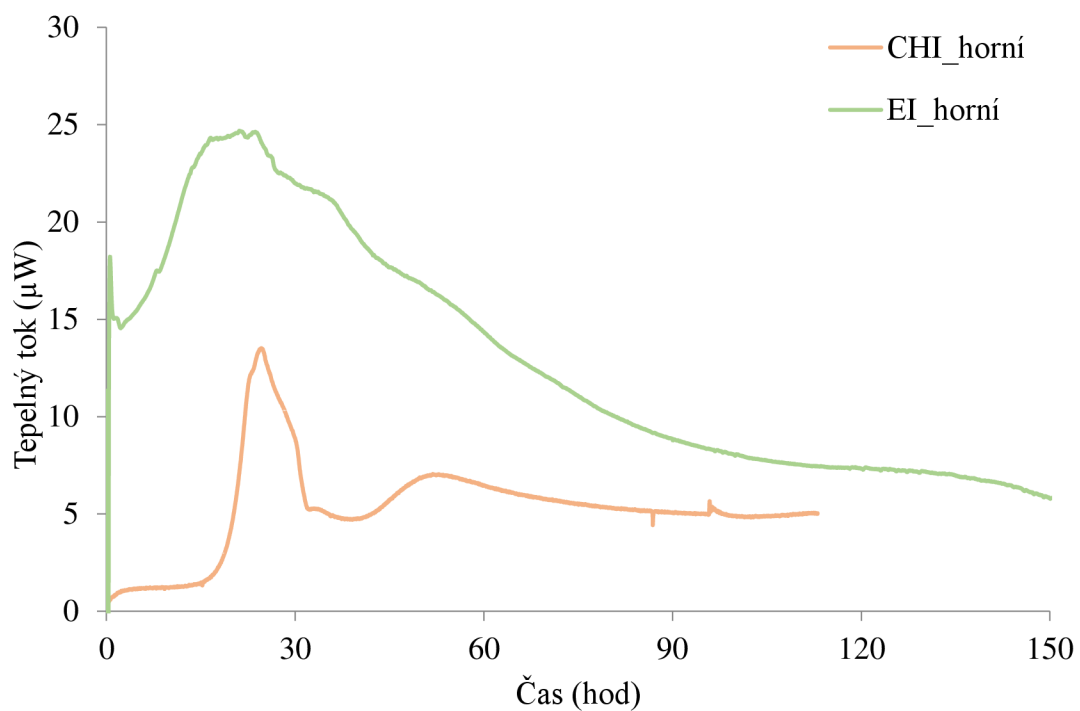
Obr. 39 Porovnání tepelných toků enzymaticky izolovaných kutikul z horní a spodní strany listu při teplotě měření 25°C



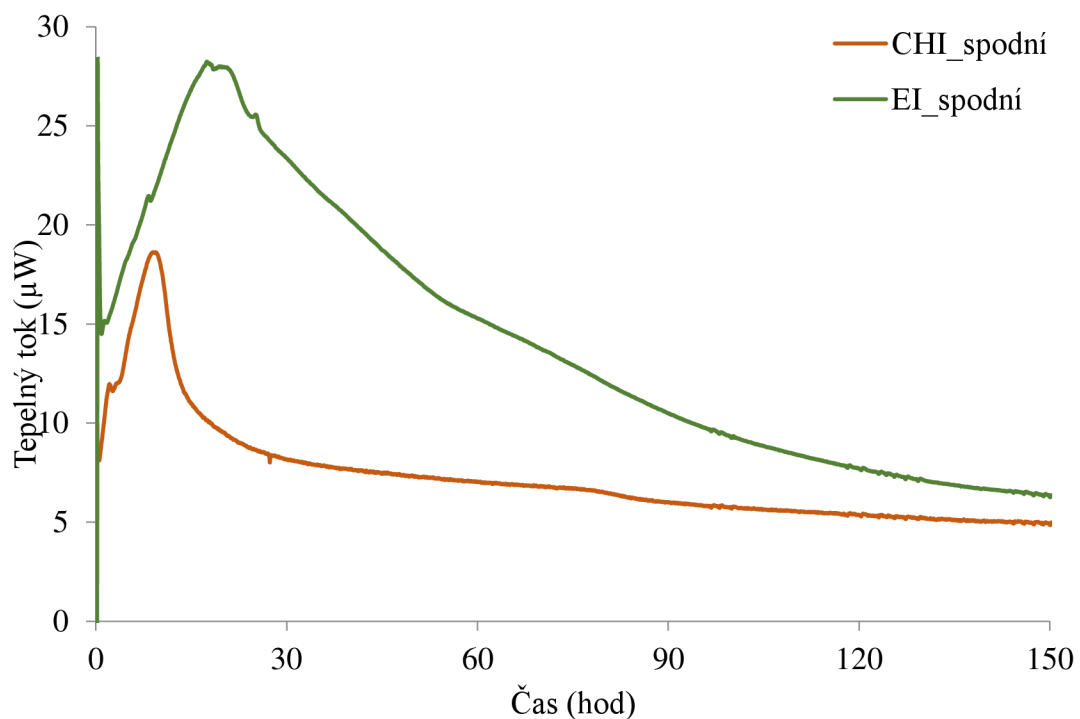
Obr. 40 Porovnání tepelných toků chemicky a enzymaticky izolovaných kutikul ze spodní strany listu při teplotě měření 25°C



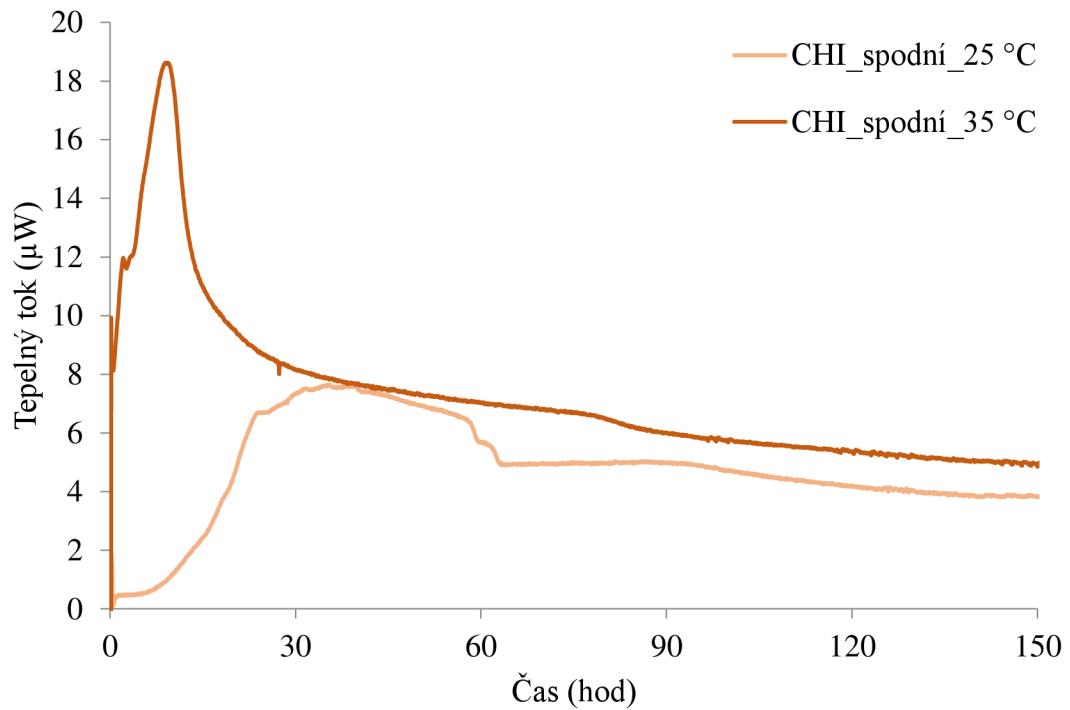
Obr. 41 Porovnání tepelných toků chemicky izolovaných kutikul z horní a spodní strany listu při teplotě měření 35°C



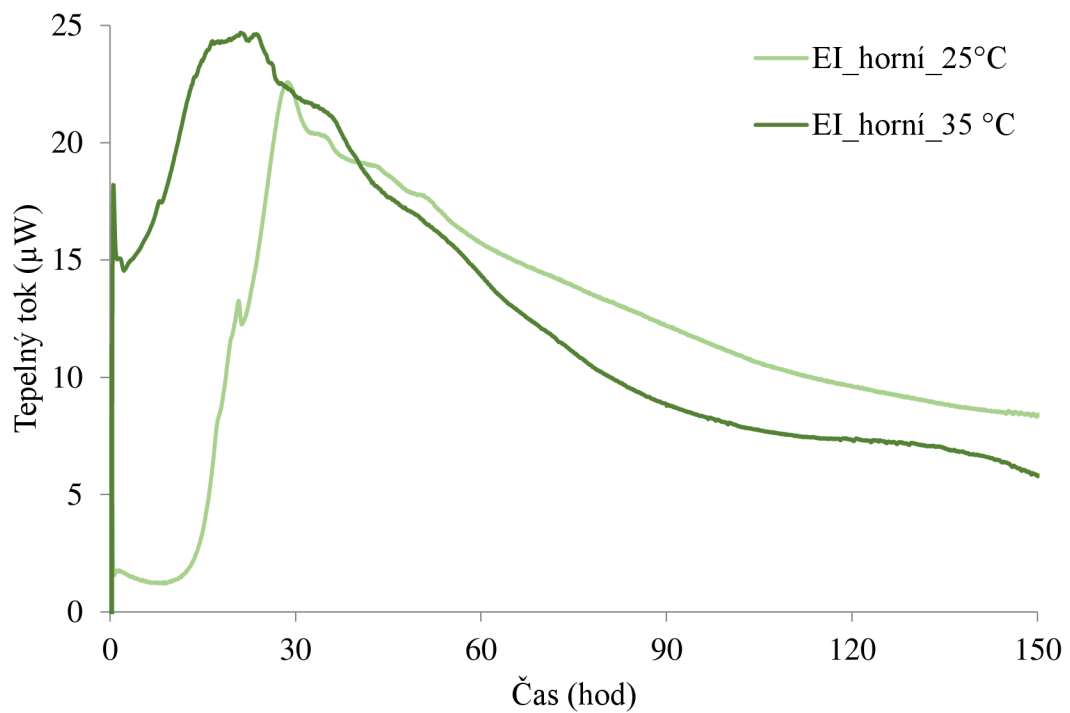
Obr. 42 Porovnání tepelných toků chemicky a enzymaticky izolovaných kutikul z horní strany listu při teplotě měření 35°C



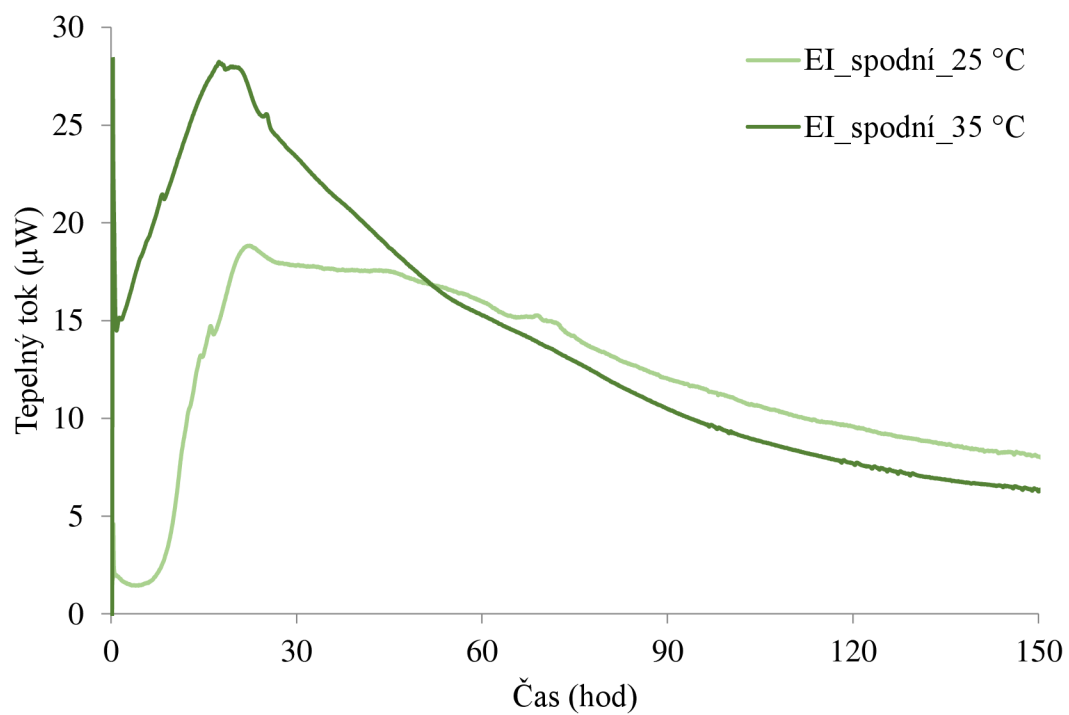
Obr. 43 Porovnání tepelných toků chemicky a enzymaticky izolovaných kutikul ze spodní strany listu při teplotě měření 35°C



Obr. 44 Porovnání tepelných toků chemicky izolovaných kutikul ze spodní strany listu při teplotách měření 25°C a 35°C

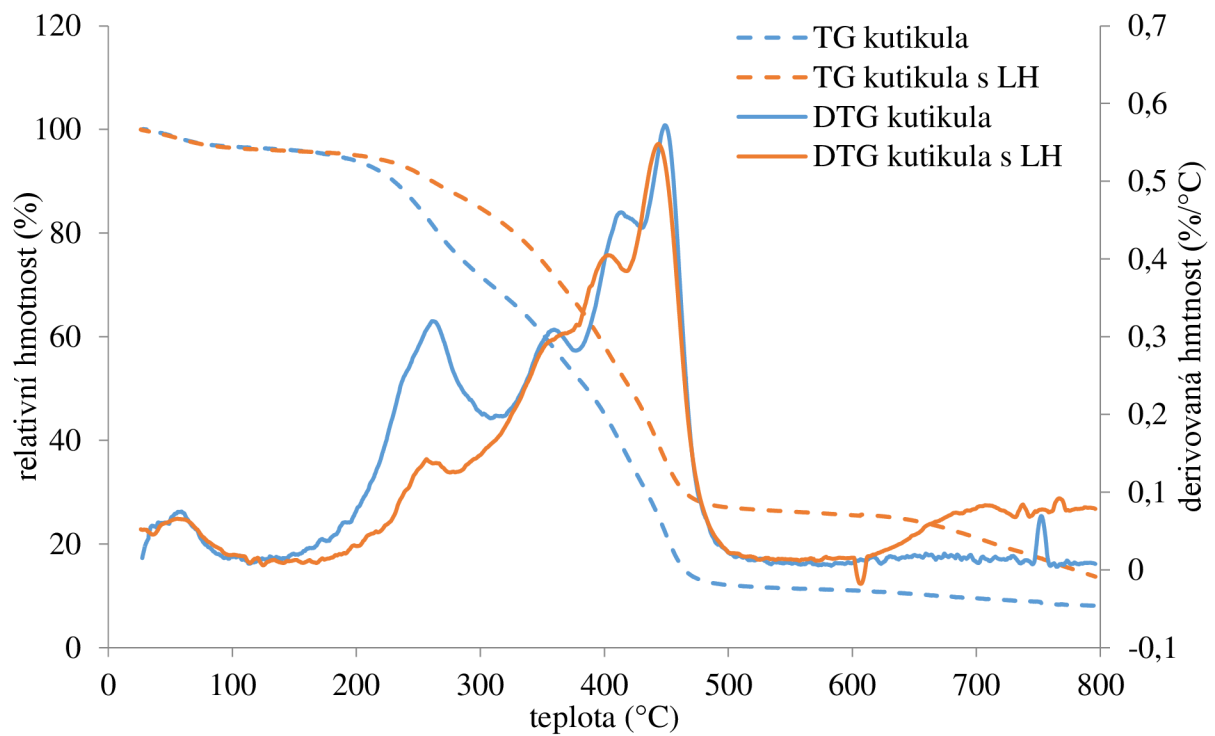


Obr. 45 Porovnání tepelných toků enzymaticky izolovaných kutikul z horní strany listu při teplotách měření 25°C a 35°C

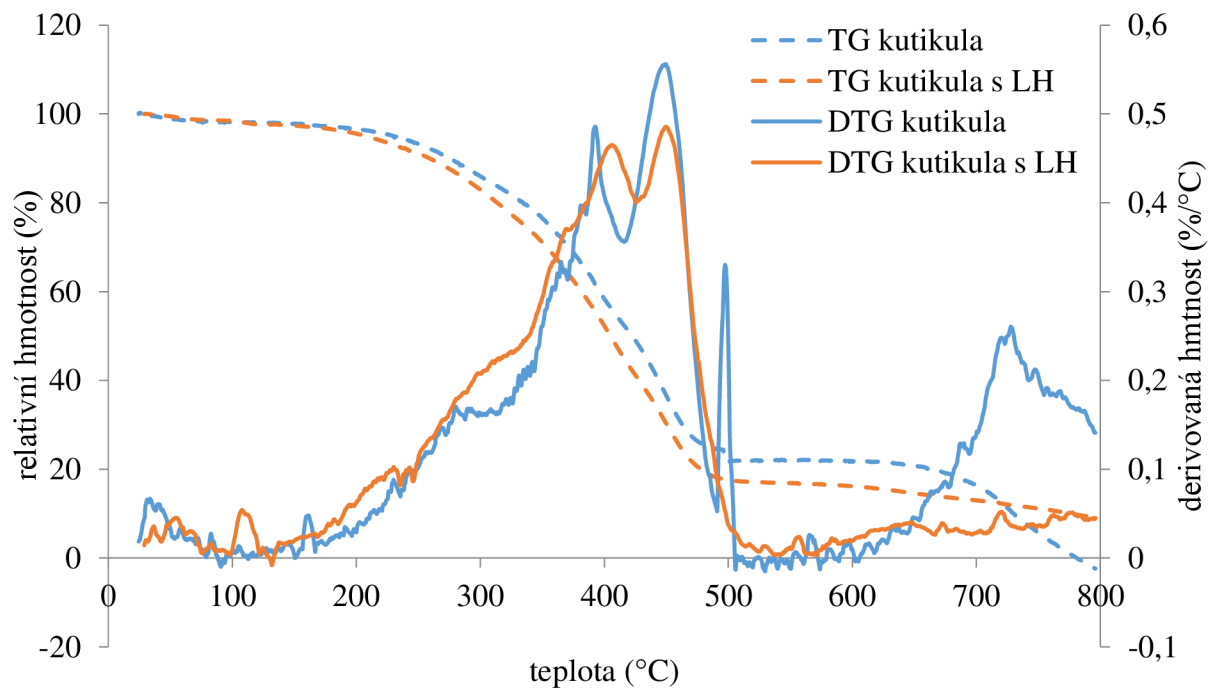


Obr. 46 Porovnání tepelných toků enzymaticky izolovaných kutikul ze spodní strany listu při teplotách měření 25°C a 35°C

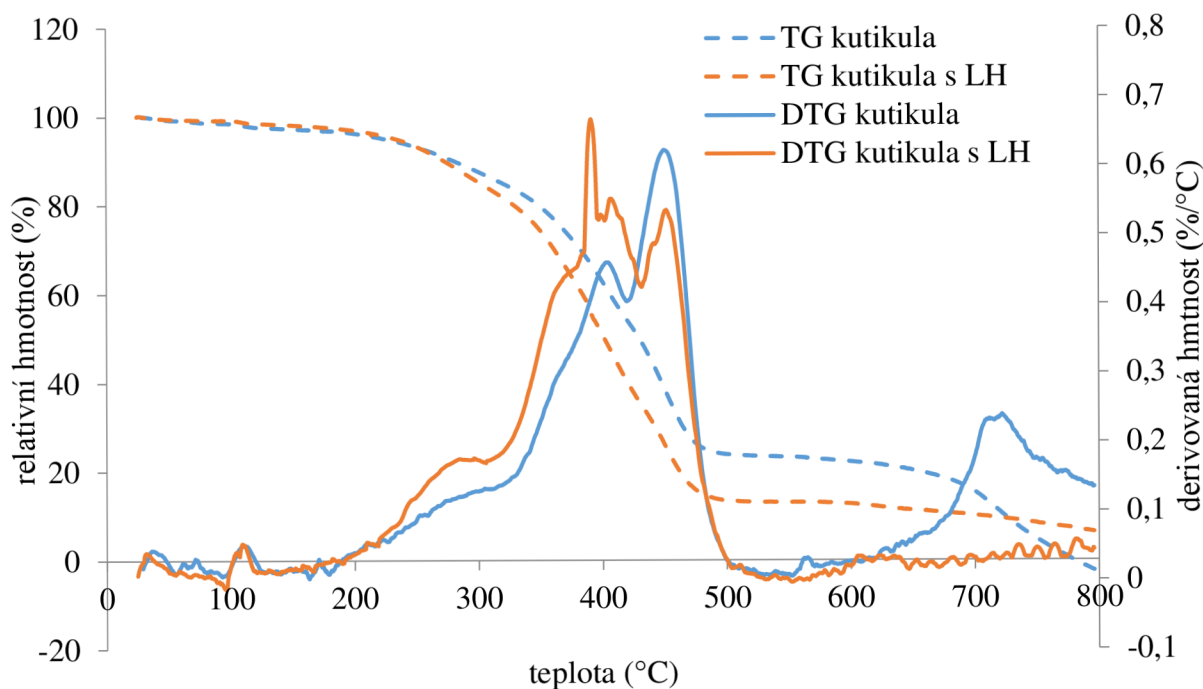
10.2 Grafy termogravimetrické analýzy



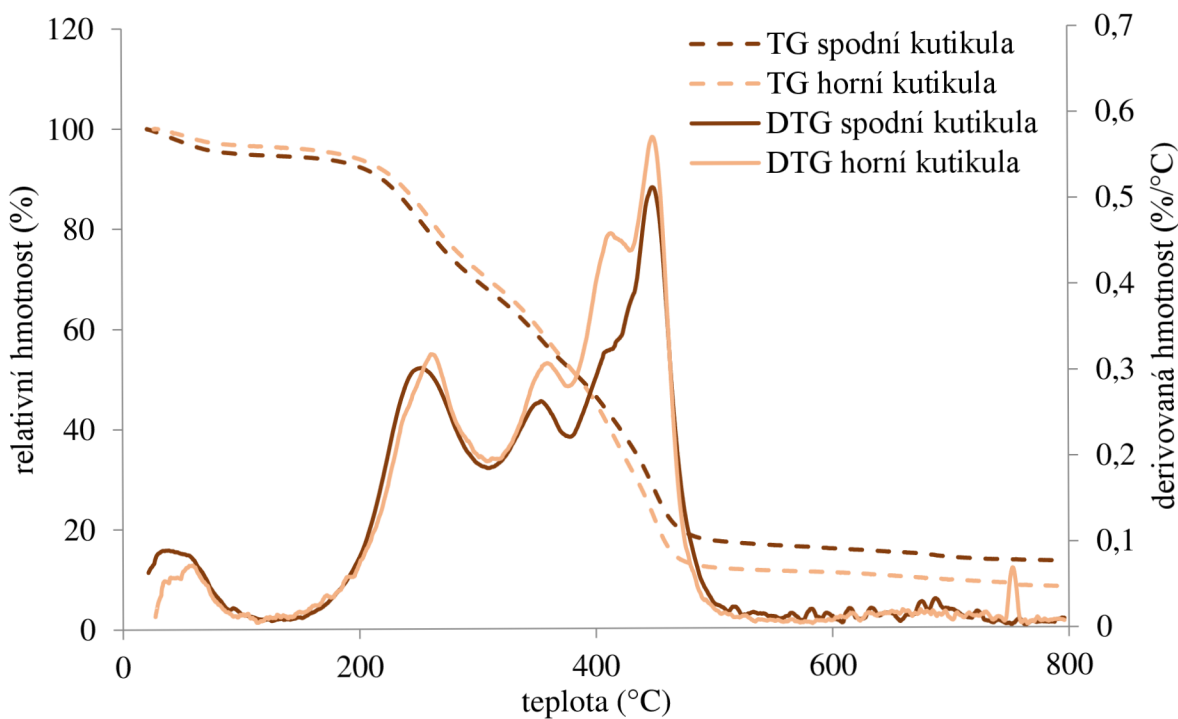
Obr. 47 Závislost úbytku hmotností kutikul izolovaných CHMI z horní strany listu na teplotě. Modrá křivka znázorňuje čisté kutikuly, hnědá křivka kutikuly máčené v Lignohumátu.



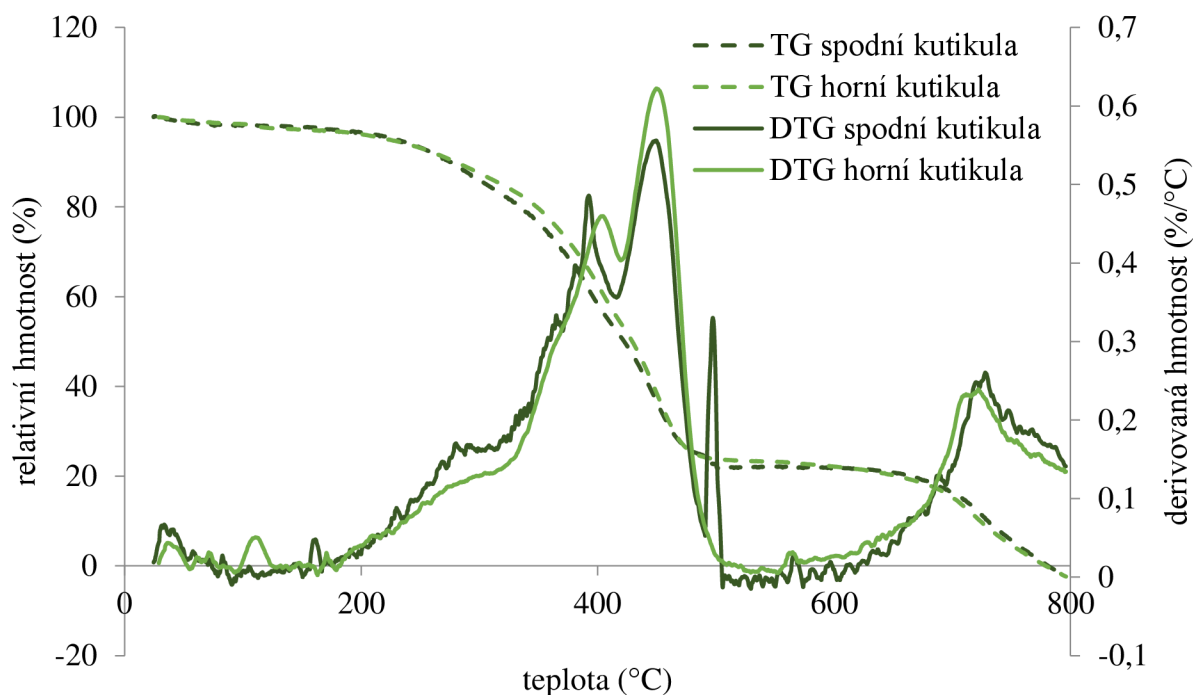
Obr. 48 Závislost úbytku hmotností kutikul izolovaných EMI ze spodní strany listu na teplotě. Modrá křivka znázorňuje čisté kutikuly, hnědá kutikuly máčené v Lignohumátu.



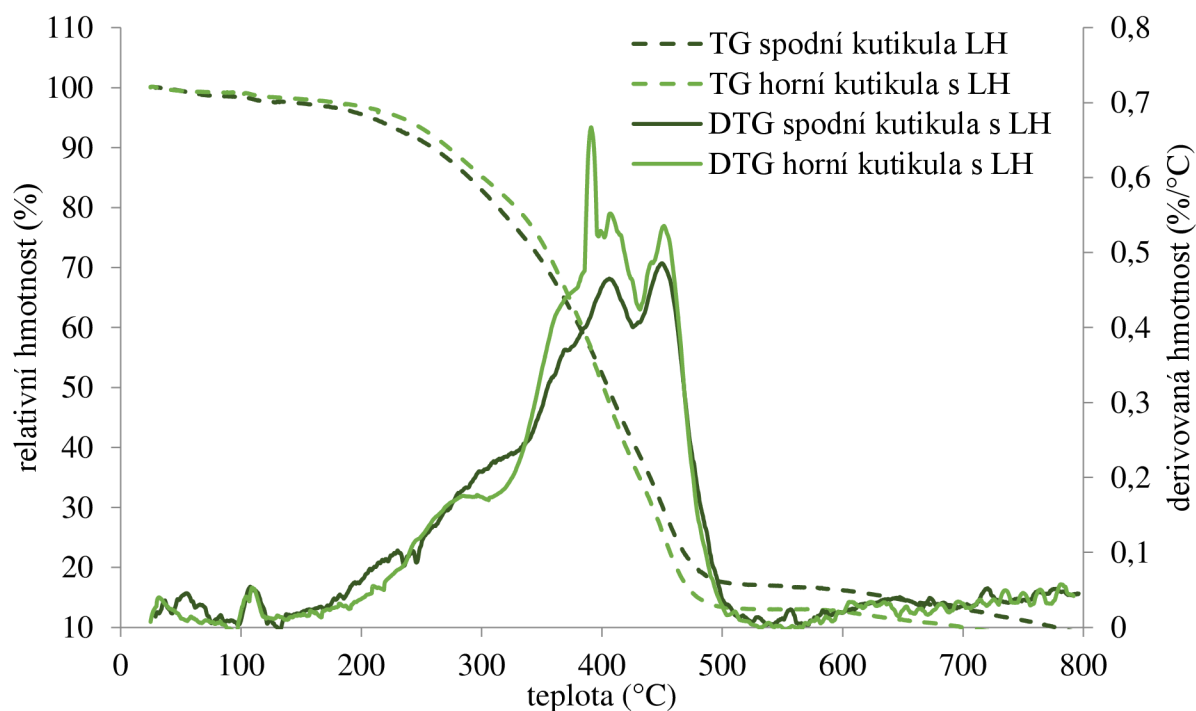
Obr. 49 Závislost úbytku hmotností kutikul izolovaných EMI z horní strany listu na teplotě. Modrá křivka znázorňuje čisté kutikuly, hnědá kutikuly máčené v Lignohumátu.



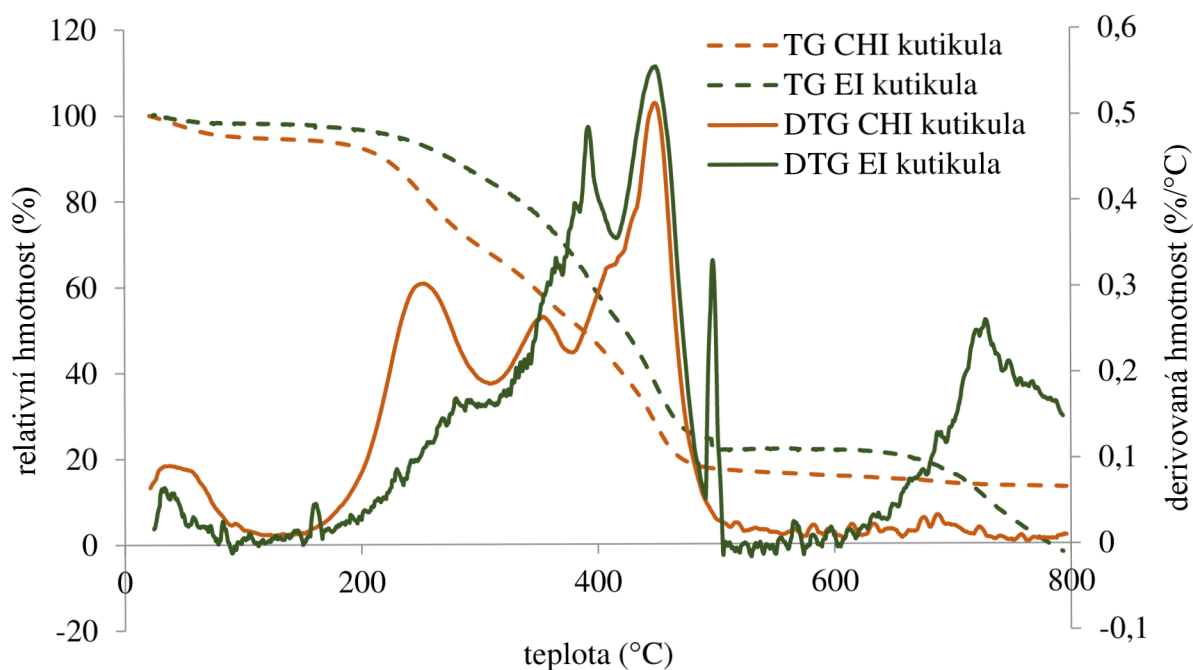
Obr. 50 Závislost úbytků hmotností kutikul izolovaných CHMI na teplotě. Světlá křivka znázorňuje horní kutikulu, tmavá spodní kutikulu.



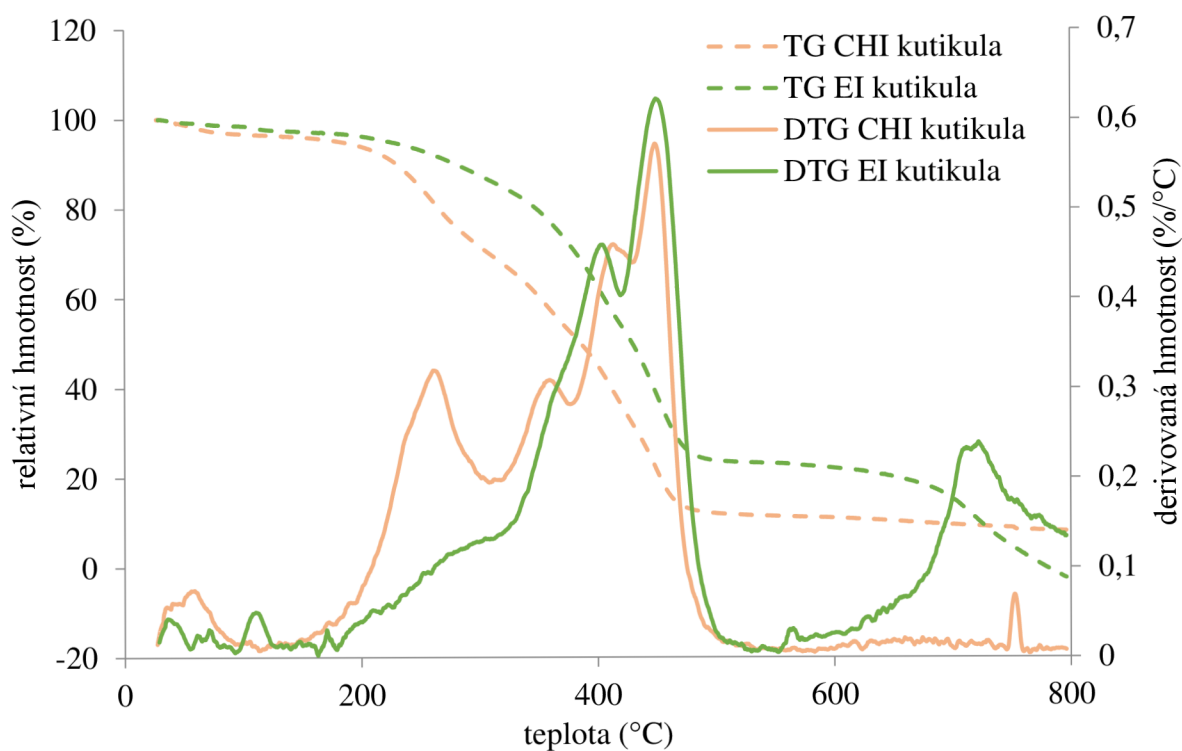
Obr. 51 Závislost úbytku hmotností kutikul izolovaných EMI na teplotě. Světlá křivka znázorňuje horní kutikulu, tmavá spodní kutikulu.



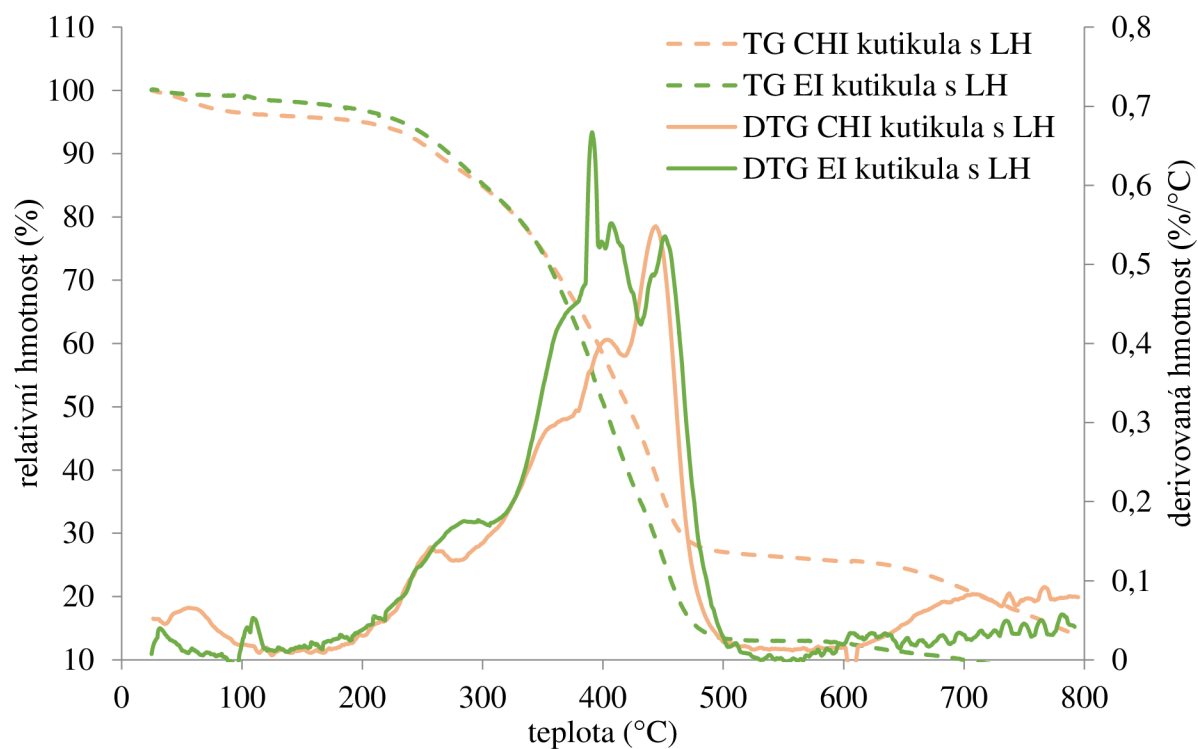
Obr. 52 Závislost úbytků hmotností kutikul izolovaných EMI máčených v Lignohumátu na teplotě. Světlá křivka znázorňuje horní kutikulu, tmavá spodní kutikulu.



Obr. 53 Závislost úbytků hmotností čistých spodních kutikul izolovaných CHMI (hnědá křivka) a EMI (zelená křivka) na teplotě.



Obr. 54 Závislost úbytků hmotností čistých horních kutikul izolovaných CHMI (hnědá křivka) a EMI (zelená křivka) na teplotě.



Obr. 55 Závislost úbytků hmotností spodních kutikul máčených v Lignohumátu izolovaných CHMI (hnědá křivka) a EMI (zelená křivka) na teplotě.