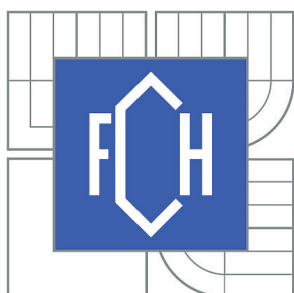


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

STUDIUM TRANSPORTU HUMINOVÝCH LÁTEK SKRZ ROSTLINNÉ KUTIKULY

STUDY ON THE TRANSPORT OF HUMIC ACIDS THROUGH THE PLANT CUTICLES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MARCELA LAŠTŮVKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. PETR SEDLÁČEK, Ph.D.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0806/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Bc. Marcela Laštůvková	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Ing. Petr Sedláček, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Jiří Smilek	

Název diplomové práce:

Studium transportu huminových látek skrz rostlinné kutikuly

Zadání diplomové práce:

- 1) Vypracovat literární rešerši na téma: Metody studia transportu aktivních látek (pesticidů, živin) skrz rostlinné kutikuly.
- 2) Na základě literární rešerše navrhnout a optimalizovat vhodnou laboratorní metodiku studia transportu huminových látek skrz kutikuly.
- 3) Na základě rozsáhlého souboru experimentů zhodnotit i) schopnost testovaných huminových látek penetrovat skrz kutikulu do listů, ii) praktickou využitelnost navržené metody.

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Marcela Laštůvková
Student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na problematiku foliárního typu hnojení, které v dnešní době představuje jedno z nejčastěji používaných aplikací komerčních hnojiv vůbec. Náplní této práce je studium rostlinných kutikul, coby tenkých vrstev na povrchu listu, které umožňují regulaci transportu vody, nutrientů a zároveň se podílí na ochraně rostlin před vnějšími biotickými i abiotickými vlivy. Pro charakterizaci těchto tenkých membrán byla využita metoda fluorescenční a optické mikroskopie a profilometrie.

Hlavním cílem předložené práce je optimalizace a otestování metodiky experimentálního studia transportu komerčního preparátu na bázi huminových kyselin skrz rostlinné kutikuly a syntetické porézní membrány s definovanou velikostí pórů. Studium transportu je realizováno metodami difúzního páru a neustálené difúze v hydrogelovém porézním prostředí za účelem studia a porovnání transportu lignohumátu přes přírodní a syntetické membrány.

Součástí řešení problému je také charakterizace hydrogelových systémů, za tímto účelem bylo využito reologie, rtuťové porozimetrie a skenovací elektronové mikroskopie. Poznatky z této diplomové práce mohou sloužit jako modelový příklad pro studium foliární penetrace různých typů aktivních látek – pesticidů, herbicidů, fungicidů, NPK či právě huminových kyselin do listů rostlin.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on foliar fertilization. It is nowadays one of the most widespread types of application of commercial fertilizers. Concern of this thesis is the study of plant cuticles as a thin layer on the leaves. These thin membranes are responsible for regulation of water transport and nutrients. Further function of plant cuticles is the mechanical protection of the outer part of the plant. Plant cuticles were characterized by fluorescence spectroscopy, classical optical microscopy and profilometry.

The main aim of this thesis is the optimization and verification of experimental methodology aimed to the transport of commercial humic product through plant cuticles by simple diffusion techniques. The results obtained by presented diffusion techniques of humic product through plant cuticles were correlated with the same diffusion experiments through synthetic membranes with defined pore size and density. The study on transport of commercial humic product was realized in hydrogel medium by two different diffusion methods – non-stationary diffusion technique and diffusion couple.

The important part of this diploma thesis is the characterization of supported hydrogel matrix by rheology tests, mercury intrusion porosimetry and scanned electron microscopy. Conclusions of this diploma thesis could be used for improving of efficiency of foliar fertilization.

KLÍČOVÁ SLOVA

foliární hnojení; rostlinné kutikuly; huminové kyseliny; hydrogely; difúze

KEY WORDS

foliar fertilization; plant cuticles; humic acids; hydrogels; diffusion

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.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že diplomová práce byla vypracována samostatně a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně ocitovány. Tato 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.

.....
Bc. Marcela Laštůvková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. za vynikající vedení, cenné rady a hlavně vynaloženou energii a čas, který mi při řešení a vypracování této diplomové práce věnoval. Ráda bych také poděkovala Ing. Jiřímu Smilkovi za předání cenných rad, zkušeností a celkovou pomoc při řešení problémů s diplomovou prací. Spolupráce s těmito lidmi pro mě byla velkou motivací. Zvláštní poděkování patří mé rodině, která mě během celého studia tolerovala a podporovala.

Tato diplomová práce byla podpořena projektem „Centrum materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně“ č. CZ.1.05/2.1.00/01.0012 z ERDF.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CÍLE PRÁCE	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	Huminové látky a jejich rozmanitá role v přírodě	10
3.1.1	Úvod do problematiky huminových látek	10
3.1.2	Klasifikace a charakterizace huminových látek	11
3.1.3	Vznik huminových látek	14
3.1.4	Huminové kyseliny, jejich charakteristika a struktura	17
3.1.5	Využití huminových kyselin	18
3.2	Listová hnojiva a mechanismus jejich účinku	19
3.2.1	Klasifikace hnojiv	20
3.2.2	Foliární typ hnojení	22
3.2.3	Listová kutikula – hlavní bariérová vrstva při foliárním hnojení	23
3.3	Využití agarózových hydrogelů jako modelového difúzního média	27
3.3.1	Agaróza	27
3.3.2	Příprava a vlastnosti hydrogelů	28
3.3.3	Experimentální studium a matematický popis difúzních procesů	29
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	33
4.1	Metody izolace rostlinných kutikul	33
4.1.1	Enzymatická metoda izolace	33
4.1.2	Chemická metoda izolace	34
4.2	Studium transportu kapalných látek přes rostlinné kutikuly	35
4.3	Studium porozity hydrogelových systémů	36
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
5.1	Použité chemikálie	39
5.2	Použitá instrumentace a další zařízení	39
5.3	Separace rostlinných kutikul z listů	40
5.4	Enzymatická metoda separace kutikul	40
5.4.1	Chemická metoda separace kutikul	42
5.5	Charakterizace používaných materiálů	43
5.5.1	Charakterizace rostlinných kutikul	43
5.5.2	Charakterizace agarózových hydrogelů	44

5.6	Difúzní experimenty	46
5.6.1	Příprava agarózových gelů	46
5.6.2	Experimentální studium volné difúze skrz kutikulu	48
6	DISKUZE A VÝSLEDKY	50
6.1	Separace rostlinných kutikul	50
6.2	Charakterizace použitých materiálů	50
6.2.1	Charakterizace rostlinných kutikul	50
6.2.2	Charakterizace biopolymerních hydrogelů	64
6.3	Difúzní experimenty	69
6.3.1	Studium transportu HL skrz kutikulu metodou difúzního páru	69
6.3.2	Studium transportu huminových látek skrz standardní membrány	76
6.3.3	Difúze z roztoku lignohumátu	78
6.3.4	Syntetické membrány s definovanými póry	79
7	ZÁVĚR.....	82
8	POUŽITÁ LITERATURA	84
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	91
9.1	Použité zkratky	91
9.2	Použité symboly	92
10	SEZNAM PUBLIKACÍ	93
11	SEZNAM PŘÍLOH.....	94

1 ÚVOD

Předmětem našeho výzkumu jsou huminové kyseliny, což jsou látky, které se spolu s chemicky sprízněnými frakcemi (fulvinové kyseliny a huminy) přirozeně vyskytují v půdě, sedimentech a tzv. oxyhumolitech. Souhrnně tento komplexní organický materiál nazýváme jako huminové látky. Unikátní vlastnosti huminových látek, především huminových kyselin, lidé využívali ke svému užitku již odedávna, neboť tento materiál pozitivně ovlivňuje nejen kvalitu a úrodnost půdy, ale také blahodárně působí na kvalitu, růst a výnosnost plodů rostlin. Díky těmto významným vlastnostem se huminové látky také staly předmětem zájmu široké vědecké společnosti.

Huminové kyseliny mohou nabývat ve svém přirozeném prostředí různých forem. Jednou z nich je např. forma v podobě koloidních roztoků nebo se mohou vyskytovat v pevné konzistenci, kde některé z těchto druhů forem jsou schopny v prostředích o vysoké vlhkosti bobtnat a vytvářet tak hydrogelové formy.

Vzhledem k tomu, že tato diplomová práce je zaměřena na transport huminových preparátů, přes rostlinné kutikuly, což má simulovat aplikaci foliárního hnojení, byly pro tyto studie využity hydrogelové formy huminových látek, v našem případě komerčního lignohumátu draselného, který byl poskytnut od firmy Amagro, s.r.o. Tato hydrogelová prostředí se vyznačují celou řadou unikátních vlastností z hlediska studia difúzních procesů. Umožňují monitorovat difúzní procesy bez celé řady rušivých vlivů (tepelné nebo mechanické konvekce) ve vzorcích o přesně definovaném tvaru a rozměrech (což je nezbytné pro korektní vyhodnocení experimentů). Zároveň jsou tyto materiály tvořeny až z 99 hm. % vodou, čímž jsou jednak schopny simulovat přirozené podmínky, ve kterých se huminové látky běžně vyskytují, a kromě toho nejsou difúzní experimenty v tomto prostředí časově náročné (difúze probíhá prakticky stejně rychle jako v roztoku). Další neodmyslitelnou výhodou těchto materiálů je jednoduchost a rychlost přípravy.

Teoretická část této diplomové práce je zaměřena na problematiku foliárního hnojení a komplexního pohledu na transportní procesy aktivních látek přes rostlinné kutikuly v hydrogelových maticích. Značná pozornost je věnována konkrétním studovaným materiálům (huminové látky, agarózové hydrogely) a dále rostlinným kutikulám jako přirozené bariérové vrstvě ovlivňující příjem a akumulaci foliárních hnojiv v rostlině.

Experimentální část se v první řadě věnuje optimalizaci různých způsobů izolace rostlinných listových kutikul a následně objektivnímu posouzení a charakterizaci takto získaných kutikul. Pro studium rostlinných kutikul bylo využito optické a fluorescenční mikroskopie a také profilometrie, díky nimž bylo možné získat více informací o struktuře, očekávanému bariérovému chování a degradaci těchto přirozených rostlinných membrán. Pro potřeby následných difúzních experimentů byly také komplexně charakterizovány modelové hydrogelové materiály, které byly podrobeny studiu pod stereomikroskopem, následně byly zkoumány skenovacím elektronovým mikroskopem, rtuťovým porozimetrem a reometrem. Díky těmto metodám byly stanoveny distribuce velikosti pórů přítomných v jednotlivých typech agarózových hydrogelů (1 hm. % agaróza, 1 hm. % agaróza s 1 hm. % lignohumátem). Dále byly mimo jiné získány informace o jejich struktuře a mechanických vlastnostech relativních pro popis transportních procesů v těchto materiálech.

Následně se praktická část předložené práce zabývá transportními procesy aktivních látek (lignohumát draselný) uskutečněnými právě v hydrogelových systémech přes izolované rost-

linné kutikuly, a to metodou difúzního páru a volnou difúzí v polonekonečném prostředí. Tyto experimenty byly vizuálně posuzovány a následně objektivně vyhodnoceny, k čemuž bylo využito především UV-VIS spektrofotometrie, kdy z naměřených dat mohly být vyhodnoceny transportní parametry (efektivní difúzní koeficient) posuzující míru těchto procesů.

2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem předložené diplomové práce bylo navrhnout a optimalizovat metodiku studia transportu komerčních přípravků na bázi huminových látek skrz rostlinné kutikuly a následnou kvantifikaci tohoto transportu na základě jednoduchých difúzních experimentů vyhodnocených pomocí vhodných matematických modelů. Dalším cílem práce bylo charakterizovat rostlinné kutikuly z hlediska morfologie, distribuce pórů a objasnit tak možné vlivy na transport aktivních látek. V prvé řadě byla vypracována rešerše na téma penetrace nutričních látek skrz tenké kutikuly rostlin, které se nacházejí na povrchu listů.

Při řešení této diplomové práce byly využity chemické a enzymatické metody izolace rostlinných kutikul z jednoho druhu rostliny bobkovišně lékařské (*Prunus laurocerasus*). Hlavní pozornost byla věnována vlivu izolace rostlinných kutikul na jejich bariérové schopnosti a na případné morfologické změny kutikul. Zároveň byly tyto přírodní bariérové systémy porovnávány s komerčními, syntetickými membránami, s přesně definovanou velikostí a distribucí pórů.

V rámci navržených difúzních experimentů byly bariérové vlastnosti kutikul studovány nejprve metodou *difúzního páru*. Tyto experimenty byly realizovány pro dva typy kutikul, které byly izolovány ze stejného druhu listu, dvěma různými způsoby (chemicky a enzymaticky). Následně byly tyto experimenty realizovány také metodou volné difúze v polonekonečném prostředí.

V rámci posouzení morfologických a chemických změn, způsobených rozdílnou metodou izolace, byly rostlinné kutikuly podrobeny studiu na *optickém a fluorescenčním mikroskopu*. Tloušťka jednotlivých membrán byla posuzována měřením na *profilometru*.

Vzhledem k tomu, že difúzní procesy byly realizovány v 1 hm. % agarózových hydrogelech, byly provedeny také podrobné fyzikálně-chemické charakterizace těchto porézních materiálů. Mechanické vlastnosti byly studovány pomocí jednoduchých oscilačních testů, distribuce velikosti pórů byla analyzována *rtuťovou porozimetrií*, vnější morfologie povrchu hydrogelů byla studována *stereomikroskopem* a vnitřní struktura hydrogelů byla analyzována *skenovací elektronovou mikroskopií*.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Huminové látky a jejich rozmanitá role v přírodě

3.1.1 Úvod do problematiky huminových látek

Půdní organická hmota je nedílnou součástí půdní biomasy, která je tvořena jak živými, tak neživými organickými látkami. Právě organická frakce, jakožto jedna z nejdůležitějších komponent půdy, vzbudila značnou pozornost zejména v zemědělství, kde se se svými účinky zřetelně podílela a podílí na fyzikálních, chemických a biologických změnách půdy. Na základě dosavadního výzkumu bylo zjištěno, že půdy vysoce obohacené o tyto látky mají významný vliv na růst rostlin a úrodnost půdy [1].

Pod pojmem půdní organická hmota (ang. *soil organic matter* – SOM) rozumíme rostlinné a živočišné zbytky v různých fázích rozkladu a ve vodě rozpustné organické látky. Ty mají odlišné tendence podléhat mikrobiálnímu rozkladu, což řídí výsledný mechanismus obohacování půdy o nutrienty (N, S, P a stopové prvky). Tento pochod může být zejména ovlivňován změnami v půdním prostředí. Celý proces obohacování půdy o esenciální látky představuje základní biologický pochod cirkulace uhlíku v podobě oxidu uhličitého a dalších prvků (dusík, síra, fosfor a stopové prvky), které se vyskytují především ve vyšších rostlinách. V některých procesech se podílí na tvorbě tzv. *stabilního humusu* [2].

Těmito prvními odstavci jsme si ujasnili, z čeho je půda vůbec složená, co jsou půdní organické látky a čím vznikají. Jak to všechno souvisí s huminovými látkami (HL)? Právě tyto látky jsou nedílnou součástí organické hmoty v půdě, kde 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 je podpořena vazba mezi některými polárními a nepolárními látkami, které mají za následek ovlivňování biologické dostupnosti některých důležitých živin (stopové prvky, aminokyseliny, lipidy, aj.). Velký význam zde hraje také stupeň humifikace, polymerizace a oxidace, který se výrazně podílí na chemických a fyzikálních vlastnostech těchto látek.

Na základě dalších výzkumů bylo prokázáno, že HL nemusí nutně vznikat pouze rozkladem organických látek, nýbrž také biosyntetickými procesy. Vědkyně Ghabbour [1], [3] dokázala izolovat HL z hnědých řas (latinsky *Pilayella littoralis*) a Radwan s kolegy [4] potvrdil přítomnost těchto látek v dalších dvou mořských rostlinách.

Výskyt huminových látek je značně rozmanitý, jejich přítomnost byla prokázána například v rašelině, lignitu, černém i hnědém uhlí a také v ropě. Dále byla přítomnost těchto látek stanovena v nižších koncentracích také v přírodních vodách a sedimentech. Studie HL byla provedena také v Antarktidě, kde v místních půdách byla taktéž potvrzena jejich existence. V těchto nežádoucích 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 taky velmi významně podílejí na koloběhu uhlíku, neboť z celkového zastoupení uhlíku na Zemi, HL tvoří 80 hm. % v terestrických a 60 hm. % v rozpuštěných vodných médiích [8].

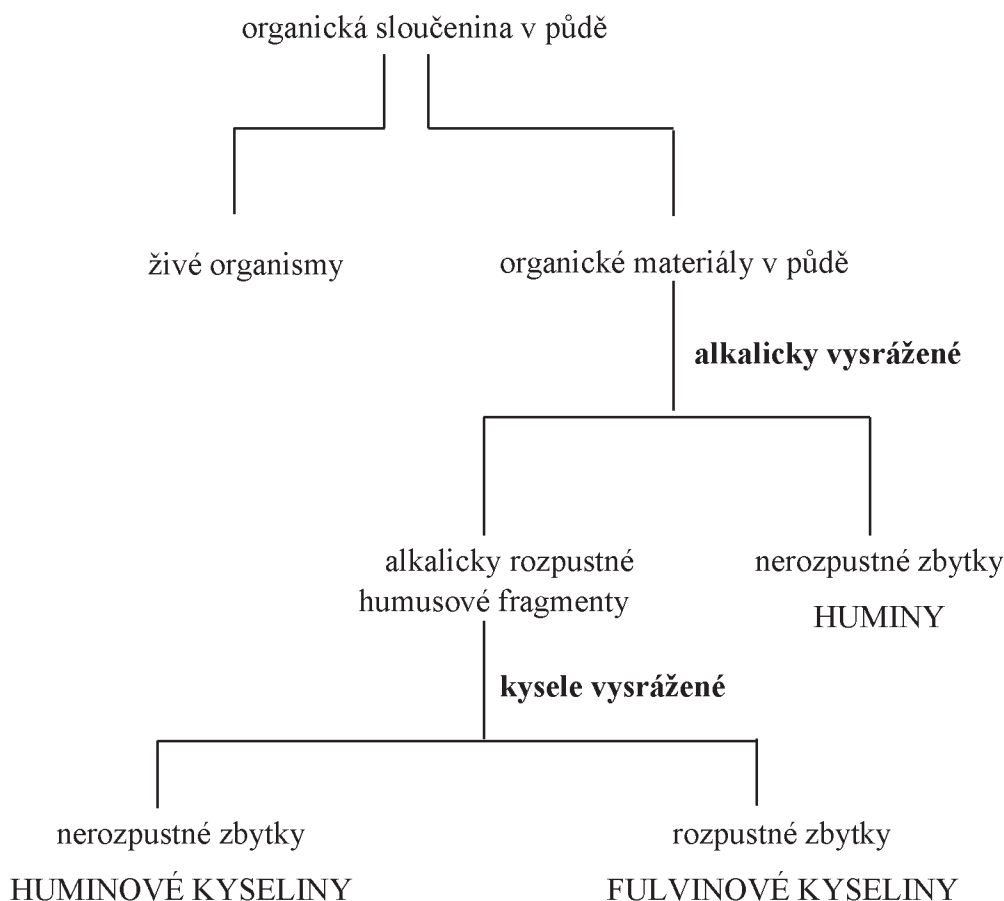
I přesto, že huminovým látkám, zejména huminovým kyselinám, je věnována poměrně velká vědecká pozornost, stále se tyto látky řadí mezi jedny z nejméně prozkoumaných přírodních materiálů vůbec. Především problematika jejich vznik a struktury je předmětem dlouhodobého a pokračujícího výzkumu mnohých vědeckých skupin po celém světě.

3.1.2 Klasifikace a charakterizace huminových látek

První studii 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. Podařilo se mu izolovat z minerálních vod světle žluté frakce huminových látek – fulvinové kyseliny (FK) [8]. Pokračovatelem Berzeliovy výzkumné linie se stal Mulder, který se také zabýval rozdělením huminových látek a vlastnostmi jednotlivých frakcí. Mimo jiné také přispěl k rozšíření poznatků o jejich rozpustnosti [11].

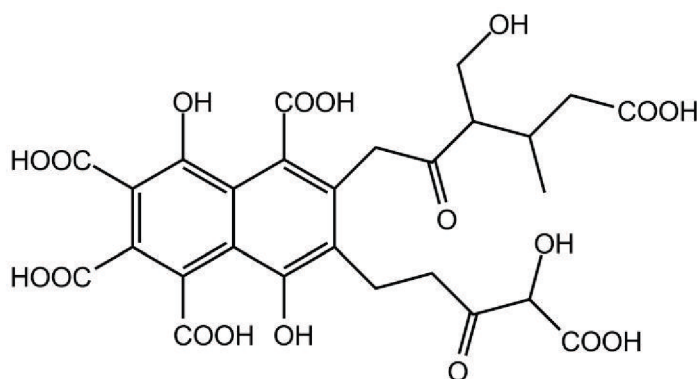
Během let 1900 – 1940 se široká vědecká obec začala zajímat o zařazení huminových látek a jejich chemickou povahu a strukturu. Do této problematiky významně přispěl vědec německého původu Oden [12], který klasifikoval huminové látky do následujících skupin: *uhelný humus*, *huminové kyseliny* (HK), *hymatomelanové kyseliny a fulvinové kyseliny* (FK) [2]. Tato charakterizace látek byla velmi blízká popisu sloučenin, jak je známe v dnešní době, avšak v dalších několika dekádách let došlo k rozšíření nových poznatků zejména v oblasti struktury, fyzikálních a chemických vlastností a aplikací těchto látek v praxi.

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



Obr. 1: Klasifikace jednotlivých frakcí huminových látek.

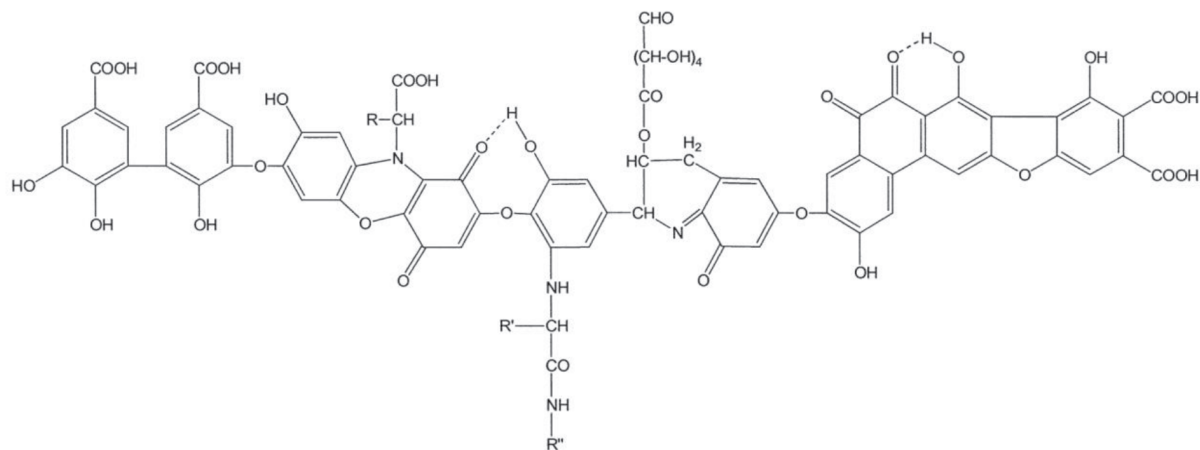
Fulvinové kyseliny (Obr. 2) jsou frakcí huminových látek, která je rozpustná jak v kyselém, tak i v bazickém prostředí. Schopnost FK rozpouštět se je tak zachována v celé rozsahu pH.



Obr. 2: Struktura fulvinových kyselin (FK) [2].

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

Ačkoli jsou huminové kyseliny nerozpustné v kyselém prostředí, dle Odena [12] existují podfrakce HK, která je nazývána *hymatomelanové kyseliny*. Tato podfrakce huminových látek se vyznačuje svojí schopností rozpouštět se v zásaditých prostředích a vysrážet se v prostředích kyselých, avšak na rozdíl od HK jsou tyto látky rozpustné také v alkoholu.



Obr. 3: Hypotetická struktura huminových kyselin (HK) dle Stevensona [2].

Huminy jsou všechny ostatní nerozpustné látky přítomné v půdní organické hmotě, které nemůžeme převést do roztoku žádnou acidobazickou úpravou.

Huminové látky jsou směsí různorodých komponent, které mají velmi podobnou chemickou strukturu. Všechny tyto sloučeniny jsou tvořeny základními stavebními jednotkami organických materiálů (C, H, O a N). Tyto prvky jsou v HL přítomny bez ohledu na jejich původ [1]. Chemická struktura je u těchto druhů sloučenin sice blízká, avšak z hlediska jejich chemických a fyzikálních vlastností se značně odlišují [14]. Základní typické vlastnosti HL vystihuje tabulka s barevným schématem (Obr. 4).

HUMINOVÉ LÁTKY				
Fulvinové kyseliny		Huminové kyseliny		Huminy
2 000 Da		nárůst molekulové hmotnosti		30 000 Da
45 %		nárůst obsahu uhlíku		62 %
48 %		pokles obsahu kyslíku		30 %
		→ pokles kyselosti		→
		→ pokles stupně rozpustnosti		→

Obr. 4: Vlastnosti huminových látek.

Jednou z odlišností jednotlivých frakcí huminových látek, která je zřejmá z Obr. 4 na první pohled, je rozdílná barevnost. Fulvinové kyseliny vykazují žluté až žlutohnědé zbarvení, zatímco huminové kyseliny jsou tmavě hnědé, v některých případech šedé. Nejtmavším

barevným odstínem se vyznačují nerozpustné zbytky huminových sloučenin (huminy), které jsou tmavě šedé až černé.

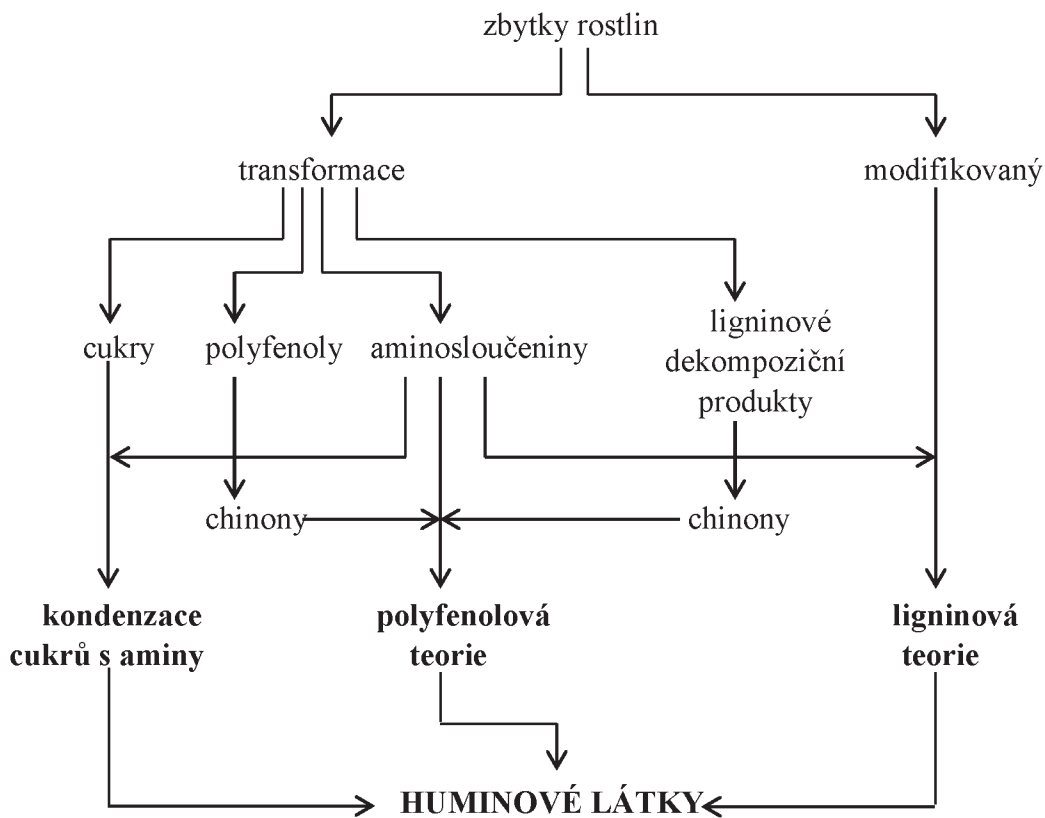
Z uvedených údajů na Obr. 4 je patrné, jakých rozdílů v molekulových hmotnostech jednotlivé frakce dosahují. Například molekulová hmotnost fulvinových kyselin se pohybuje okolo 2 000 Da. Na základě tohoto faktu můžeme tvrdit, že tato frakce huminových sloučenin disponuje nejnižší molekulovou hmotností a lze ji zařadit mezi tzv. *nizkomolekulární frakce huminových látek*. Růst molekulové hmotnosti dále pokračuje přes huminové kyseliny až k huminům, kde molekulová hmotnost může dosahovat až 30 000 Da. Tyto složky huminových látek poté nazýváme *vysokomolekulární frakce*. Kromě odlišného stupně polymerace se tato frakce HL vyznačuje také rozdílnou strukturou, odlišným počtem aromatických cyklů a funkčních skupin (karboxylová, hydroxylová, apod.).

Z dalších informací, které můžeme vyčíst z Obr. 4, stojí za zmínku procentuální zastoupení obsahu uhlíku a kyslíku v jednotlivých frakcích. Množství uhlíku roste od fulvinových kyselin k huminům, což je dáno právě vzrůstajícím počtem aromatických cyklů ve struktuře jednotlivých frakcí huminových látek. Procentuální zastoupení kyslíku naopak klesá od fulvinových kyselin směrem k huminům, protože FK disponují vyšším počtem funkčních skupin ve své struktuře, a to zejména karboxylovými, hydroxylovými a ketonickými skupinami. A jak to souvisí s kyselostí? Vzhledem k tomu, že FK obsahují vyšší počet hlavně karboxylových skupin, které jsou nositelem kyselých vodíků, chová se tato frakce huminových látek kyseleji ve srovnání s huminovými kyselinami a huminy. Samozřejmě i HK a HU obsahují kyslík ve funkčních skupinách jako je tomu u FK, ale navíc jsou přítomny také v aromatických cyklech.

Z hlediska rozpustnosti jednotlivých frakcí, jak bylo již výše zmíněno, fulvinové kyseliny jsou rozpustné v celém rozsahu pH, tedy jak v kyselém tak zásaditém prostředí. Naproti tomu huminové kyseliny jsou rozpustné ve slabě i silně alkalických roztocích, to je způsobeno tím, že jejich karboxylové a fenolické skupiny nejsou schopny disociace při nižším pH. S rostoucím pH dochází k postupné disociaci nejdříve karboxylových a následně i fenolických skupin. Na základě zmíněného faktu stojí za zdůraznění, že specifické chování huminových kyselin v roztoku souvisí i s mírou disociace funkčních skupin obsažených v základním skeletu molekuly.

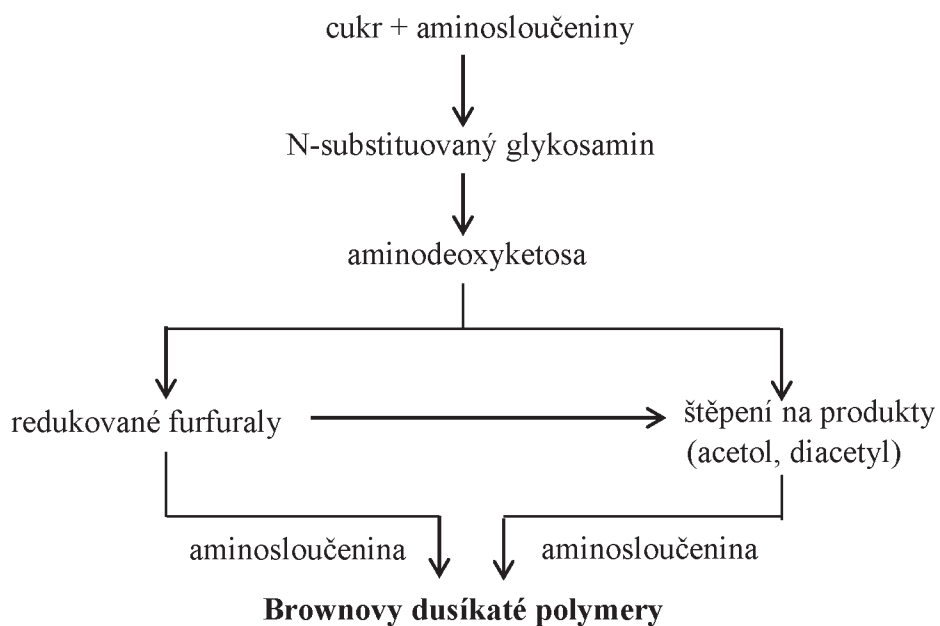
3.1.3 Vznik huminových látek

Biochemické procesy vzniku huminových látek jsou nepřetržitě studovány už od doby jejich objevení německým vědcem Achardem na konci 18. století [15], avšak přesný mechanismus vzniku HL nebyl stále dostatečně objasněn a nadále je pro nás velkou neznámou. Huminové sloučeniny jsou velmi složité systémy, které se vyvíjí na základě transformace rostlinných a živočišných zbytků (humifikace) prostřednictvím mikrobiálního metabolismu. Proces humifikace byl proto popsán několika teoriemi, zmíněny však budou tři nejznámější a vědeckou obcí nejpřijímanější. Celé schéma jednotlivých drah vzniku huminových sloučenin je uvedeno na Obr. 5 [16].



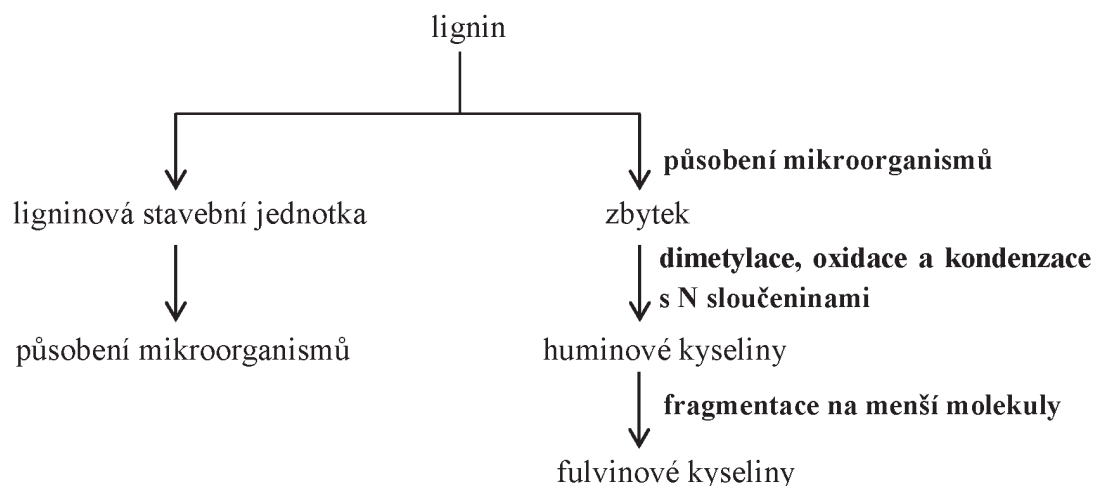
Obr. 5: Celkový přehled teorií vysvětlujících mechanismus vzniku huminových látek.

První teorii, kterou si uvedeme, je *Millardova kondenzace sacharidů s aminy*. Tento mechanismus vzniku huminových sloučenin je založen na tvorbě nízkomolekulárních látek ze sacharidů a proteinů, což je umožněno činností mikroorganismů. Ty jsou schopny rozložit složitější biopolymerní látky na cukry a aminokyseliny, které dále podléhají oxidaci, kondenzaci a následné polymerizaci (Obr. 6) [17].



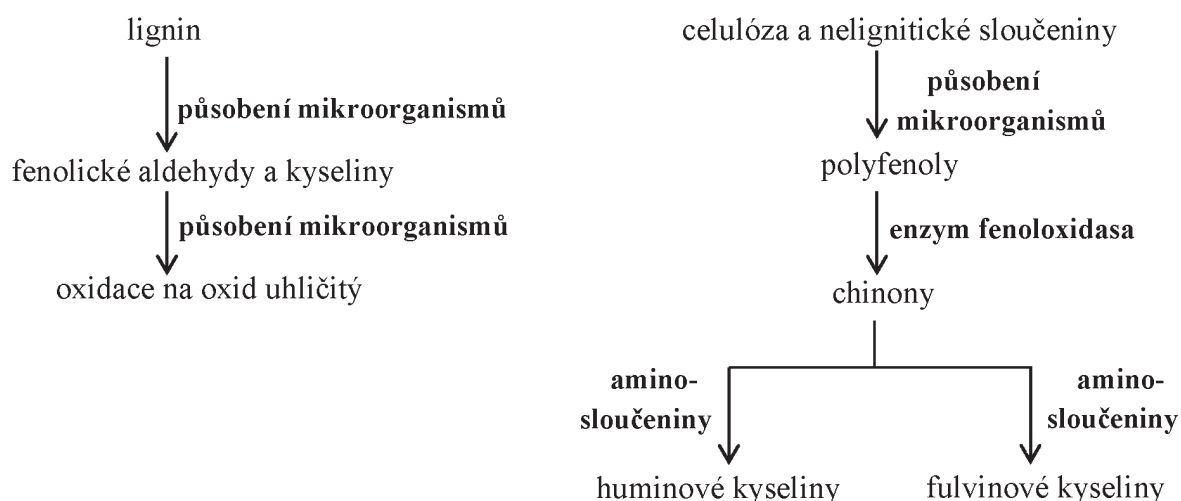
Obr. 6: Mechanismus Millardovy kondenzace sacharidů s aminy.

Druhou teorií je *Waksmanova ligninová teorie*, která byla popsána již v roce 1932. Podle ní modifikované kationty v ligninu ztrácejí methoxylové skupiny a vedou ke generaci *o*-hydroxyfenolů a oxidaci alifatických postranních řetězců za tvorby karboxylových skupin. Za předpokladu, že HL představují podle některých názorů polymerní systémy, potom by výsledkem byly huminy současně s huminovými a fulvinovými kyselinami, které by vznikly následnou oxidací a fragmentací [17]. Podrobnější znázornění tohoto mechanismu je uveden na Obr. 7.



Obr. 7: Schéma vzniku huminových látek podle ligninové teorie.

Poslední a zároveň nejvíce uznávanou teorií popisující vznik HL se stala tzv. *Flaigova polyfenolová teorie*. Východím 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, které jsou následně převedeny na huminové látky (Obr. 8) [17].



Obr. 8: Mechanismus polyfenolové kondenzace.

3.1.4 Huminové kyseliny, jejich charakteristika a struktura

Praktická část této diplomové práce je zaměřena na jednu konkrétní frakci huminových látek a to na huminové kyseliny. Proto je vhodné věnovat těmto látkám jednu z kapitol, která nám přiblíží jejich význam, vlastností a použití. Obecné vlastnosti HK byly již popsány v Kapitole 3.1.2.

Základními stavebními prvky huminových kyselin 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 [18]. Na základě dosavadního výzkumu stále nebyla přesně určena struktura těchto složitých vysokomolekulárních látek, ale je zřejmé, že jejich fyzikální a chemické vlastnosti budou značně odlišné. I přesto se huminové kyseliny hojně využívají v různých průmyslových, zemědělských či vědeckých odvětvích (o tomto tématu blíže pojednává Kapitola 3.1.5). Jednou ze základních chemických charakteristik huminových sloučenin je jejich prvkové složení (Tab. 1).

Tab. 1: Elementární zastoupení jednotlivých prvků v huminových a fulvinových kyselinách [2].

prvkové složení	humínové 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 charakteristikou těchto látek je zastoupení konkrétních funkčních skupin, které nám definují nejen strukturu, ale také do určité míry kvalitu. Kupříkladu vyšší zastoupení skupin typu karboxylových či hydroxylových zvyšuje kyselost látek, proto jsou obecně fulvinové kyseliny kyslejší než HK. Zastoupení funkčních skupin v těchto systémech je uvedeno v Tab. 2.

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

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

Široká vědecká obec se dlouhodobě zabývá také studiem molekulární struktury huminových kyselin, která se zároveň stala jedním z nejproblematictějších a nejméně objasněných témat v půdní chemii. Přitom je to právě struktura HK, která je primárně zodpovědná za barvu, reaktivitu či fyzikálně-chemické vlastnosti [2].

Znalost základní struktury HK je nutná pro pochopení role a funkce v půdě. Vzhledem k tomu, že je tato struktura značně rozmanitá a obsahuje velké množství 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 (supramolekula).

3.1.5 Využití huminových kyselin

Přirozený výskyt humusu v půdě a jeho dopad na její úrodnost je znám od pradávna, můžeme tedy tvrdit, 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, dále se také podílí na stabilizaci půdních agregátů apod.

Dříve bylo používáno uhlí jako hlavní zdroj energie. Vzhledem k tomu, že nedílnou součástí nízkoprouhelnatělé hmoty (hnědé uhlí, oxyhumolity) jsou i huminové látky, můžeme tvrdit, že v minulosti dosáhly HK mimo jiné hojného využití právě v energetickém průmyslu. Avšak s přicházející osvětou, která se týkala ochrany životního prostředí, je proces spalování fosilních paliv omezen a zároveň byl nahrazen takovými zdroji energie, které jsou šetrnější k životnímu prostředí. Tyto zdroje nazýváme jako *alternativní* a patří sem sluneční, větrné nebo vodní elektrárny [19].

Vědecká společnost se proto začala zabývat dalšími možnými uplatněními huminových kyselin. Největší aplikační potenciál huminových látek nacházíme v oblasti zemědělství, průmyslu, ochrany životního prostředí, farmacie a biochemie.

Aplikace v zemědělství

Jak již bylo zmíněno výše, huminové kyseliny jsou přirozenou součástí organické hmoty v půdě a podílí se na mnoha pozitivních procesech, které ovlivňují nejen fyzikální a chemické vlastnosti půdy, ale také růst a kvalitu rostlin. Proto se staly jednou z důležitých aditiv do celé řady hnojiv, pesticidů, půdních kondicionérů a dalších agrochemických produktů. Huminové kyseliny se také vyznačují sorpčními schopnostmi, které umožňují navázání nutričních látek, které jsou postupně uvolňovány a podílí se tak na dostatečné výživě půdy [20]. HK jsou schopny na sebe vázat také molekuly vody, čehož je možné využít v oblastech trpících na nedostatek vláhy. Takto navázané molekuly vody mohou být 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. Jak již bylo uvedeno v úvodu této kapitoly, byly huminové kyseliny používány jako součást uhlí v energetickém průmyslu jako zdroj energie, avšak z ekologického hlediska je tento typ výroby energie omezován.

Huminové kyseliny jsou rozšířeny také ve stavebnictví, kde jsou používány jako hydrofobní plniva cementů. Tyto látky ovlivňují vlastnosti těchto materiálů, zejména jejich smáčivost, disperzitu a řízené vytvrzování. Obdobně jsou huminové kyseliny využívány také v keramice [21].

Jejich dalšího využití se používá v brusných a řezacích přístrojích, kde jsou tyto látky přidávány do chladicích kapalin, ve kterých způsobují zvýšení viskozity a zároveň zde působí jako emulzifikátor. 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 [22].

Aplikace v ochraně životního prostředí

Již zmiňované sorpční schopnosti HL se využívají pro detoxikaci životního prostředí. Huminové látky se vyznačují sorpčními schopnostmi vůči běžným polutantům [23], [24]. 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 a případně po izolaci HL a extrakci vhodným činidlem z přírodního ekosystému odstraněny.

Aplikace ve farmacii a biochemii

Aplikace huminových látek v biochemii a farmacii má značné omezení a to kvůli svému zbarvení, které není možné lehce odstranit. Avšak určitých pozitivních vlastností bylo dosaženo při léčbě rakoviny dělohy, což bylo zkoumáno na laboratorních zvířatech [25], [26]. Dále se tyto látky svým působením podobají účinkům heparinu, estrogenu a řada derivátů HK byla označena jako terapeutika. Dalšího využití dosáhly huminové látky v oblasti kosmetiky, kde jsou používány k bahenním lázním a léčebným zábalům. O této problematice podrobně pojednává rozsáhlá reference [8].

3.2 Listová hnojiva a mechanismus jejich účinku

Živiny jsou pro úrodnost půdy a kvalitu rostlin velmi nezbytnými složkami a jejich aplikace může mít řadu podob. Jednou z nejrozsáhlejších je použití pevných granulí, které se aplikují na pole a po dodání vláhy (umělé zavlažování nebo přírodní – deště), dochází k jejich rozpouštění a vstřebávání do půdy a odtud do kořenů rostlin. Tato zažitá metoda byla vystřídána nově nastupující technikou tzv. *foliárním hnojením*, které je založeno na rozpouštění látek podporujících růst rostlin ve vodě nebo zakoupení vodného koncentráту výživných látek, který je dle návodu naředěn, a poté aplikován postřikujícími stroji na listy rostlin. Důležitý je ovšem fakt, aby aktivní látky aplikované do půdy či listů rostlin byly používány obezřetně, vzhledem k tomu, že přehnojení může mít kontraproduktivní efekt na úrodnost a vyčerpanost půdy.

Foliární (listové) hnojení patří mezi jeden z nejúčinnějších způsobů výživy rostlin. Na základě testů bylo dokázáno, že listové hnojení může zvyšovat výtěžek o více než 12 nebo dokonce 25 % v porovnání s konvenčním hnojením [27]. Tyto testy byly studovány v různých prostředích a za různých podmínek, v jejichž důsledku bylo prokázáno, že v případě aplikace nutričních látek přímo na listy rostlin, dochází k využití těchto nutrientů o více než 90 %. V případě užití hnojiva přímo na půdu, dochází k využití asi 10 %, kdy zbylé množství je odplaveno a nemůže se tak podílet na pozitivním ovlivnění růstu rostlin [28].

V případě písčitých půd, které se vyznačují svojí nízkou úrodností, je důležité dbát na volbu vhodné aplikace hnojiva, aby výsledek byl co nejefektivnější. V případě užití foliárního typu hnojení jsou takto podané nutriční látky až 20krát více účinné v porovnání s aplikacemi hnojiv na půdu [27]. Právě 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 zvýšení obsahu živin v půdě. Další výhodou je bezproblémový převod látek do listů, kdy v případě půdního hnojení v obdobích s nedostatkem vláhy nemusí dojít k penetraci látek do rostliny vůbec.

3.2.1 Klasifikace hnojiv

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 [29].

Hnojiva můžeme dělit dle jejich konzistence na *krystalické, granulované a kapalné*. Dále hnojiva dělíme dle jejich působení na rostliny a to na hnojiva *přímá* (obsahující rostlinné živiny) a *nepřímá* (umožňující příjem živin). Mezi hnojiva přímá řadíme **hnojiva organická** (hnůj, močůvka, zelené hnojení, tekutý hnůj, kompost apod.) a **hnojiva minerální**, která jsou vyráběna z dusíkatých nebo průmyslových hnojiv (fosforečná, draselná, dusíkatá nebo vápenatá) [30].

Organická hnojiva

Tímto pojmem označujeme hnojiva, která spadají do skupiny živočišných látek. Jedná se o chemické sloučeniny, které se vyznačují uhlovodíkovým skeletem různé délky s postranními substituenty. Spadají sem bílkoviny, které jsou tvořeny aminokyselinami, sacharidy, kdy pro rostlinnou říši je nejdůležitější celulóza, lignin, auxiny aj.

Organické látky se podílejí na tvorbě humusu v půdě a jsou tak nejdůležitější zásobárnou živin vůbec. Organická hnojiva mají velký význam pro rostliny zejména v přísunu důležitých prvků, které již byly zmíněny výše. Organická hnojiva jsou univerzálním zdrojem stavebního uhlíku, energie, živin a existuje celá řada takovýchto hnojiv, které můžeme rozdělit do cca deseti základních skupin. Mezi významná organická hnojiva řadíme rašelinu, živočišný hnůj, kompost, slámu, zelené hnojivo, kejdu a další [31].

Rašelina patří mezi kyselá hnojiva [32], která se používá 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 však kompost, pod tímto pojmem označujeme směs zeminy s organickými látkami a půdní mikroflórou. Výhodou těchto hnojiv je environmentální snášenlivost.

Minerální hnojiva

Dusíkatá hnojiva jsou vítanými nutričními látkami, 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 zesvětlením, vadnutím a zastavením růstu. V případě nadbytku dusíku v rostlinách může naopak docházet ke ztmavnutí listů, ztenčení listových kutikul či dokonce popraskáním plodů. Dusíkatá hnojiva dělíme na základě iontové formy dusíku na *nitrátová, amoniakální a amonná* [33].

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. Ledeček sodný je také výborným hnojivem, avšak jeho velkou nevýhodou je vznik sodného škraloupu na zemině, na kterou byl aplikován. Tento jev je dán schopností sodíku peptizovat půdní koloidy.

Mezi nejvýznamnější formy amonného hnojiva patří uhličitán 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 [34].

Správná aplikace dusíkatých pesticidů může mít za následek vyvážené nutriční látky jako 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. Aplikace dusíkatých hnojiv je doporučována zejména v těžších a kyselejších půdách, oproti tomu amonná hnojiva najdou výborné uplatnění v porézních půdách [27].

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 popř. půda ihned využít. Tento typ hnojiv byl v historii vyráběn kostní moučkou a koprolytem (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 vyráběna 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, reakce, teplota) a především na příjmovou kapacitu hnojené plodiny [27].

Porovnáním účinků hnojiv na bázi dusíku a fosforu se podrobněji zabývá reference [35].

Draselná hnojiva

Dalším velmi nezbytným prvkem je draslík, který rostlina přijímá poměrně ve vysoké míře. Draslík je prvek podílející se na transpiraci, fotosyntéze, při metabolismu sacharidů a dusíku dále se podílí na dělení buněk a na aktivitě enzymů. Draslík se také podílí na regulaci vody v rostlinných tělech. Přísun draslíku je doprovázen s dalšími nezbytnými biogenními prvky, jako jsou bor, hořčík či vápník. Tento typ pesticidů je vyráběn z ložisek draselných solí, jejich výroba spočívá v evaporaci mořské vody, která je na tyto prvky velmi bohatá [27].

Nejznámějšími draselnými solemi je karnalit (podvojná sůl chloridu draselného a hořečnatého), sylvinit (směs chloridu draselného a sodného), kainit (směs chloridu draselného a síranu hořečnatého) a kainit II, který je směsí kainitu a chloridu sodného. Studium účinků draselných hnojiv se zabývají například v publikaci [36].

Vápenatá hnojiva

Hlavním zdrojem vápníku na výrobu vápenatých hnojiv jsou horniny hořečnato-vápenaté a vápenaté. Tento druh hnojiv můžeme rozdělit na hnojiva s vápníkem uhličitanovým, síranovým, žíravým (hydroxid nebo oxid vápenatý) a křemičitanovým [27].

Vápník je rostlinami a půdou přijímán ve formě kationtu vápenatého. Vápník je důležitý pro tvorbu kořenového systému a hraje také roli v metabolickém procesu rostlin. Nedostatek tohoto prvku se projevuje zastavením růstu a postupným odehňváním kořenového balu (kořeny spolu s okolní zeminou). Další negativní projevy se týkají i skeletu rostliny, který se projevuje blednutím listů a jejich zakřivením [27].

V dnešní době se hnojiva různě kombinují jako v referenci [37], kde využívají alginátu vápenatého jako jakousi nosnou matici pro hnojiva na bázi fosforu, které jsou tak pozvolna uvolňována do půdy.

Hořečnaté hnojiva

Hořčík hraje nezastupitelnou úlohu při fotosyntetických procesech, je totiž součástí molekuly chlorofylu (porfírové jádro s centrálním atomem hořčíku). Nedostatek tohoto prvku způsobuje různé formy chlorózy a nekrózy rostlinných pletiv [27].

Studiem pozitivních účinků hořečnatých hnojiv a jejich porovnání s jinými typy hnojiv se zabývaly v referenci [38].

3.2.2 Foliární typ hnojení

Tento proces hnojení se začal prudce rozvíjet od 50. let 20. století [28], o což se začalo více zajímat i obyvatelstvo, neboť v první řadě rostl velký strach z hlediska znečišťování životního prostředí, a to zejména půd, řek a podzemních vod. Další obavy z této nové aplikační technologie rostly také v oblasti potravinářství, neboť aplikace „škodlivých“ fungicidů, pesticidů a herbicidů by měly nežádoucí dopad také na zdraví obyvatel.

Dnes jsou již tyto aplikační metody natolik vyvinuty, že jejich působení má naopak pozitivní vliv na dlouhodobou trvanlivost potravin. Foliární hnojení například fosfáty nebo draselnými solemi vyvolalo naopak systémovou ochranu proti rostlinným škůdcům či patogenům u různých druhů rostlin (okurky, kukuřice, vinná réva, jablka, mango, růže apod.) [28].

Foliární hnojení patří mezi formy aplikace nutričních látek v kapalném skupenství na rostliny prostřednictvím postřikovačů a jiných podobných zařízení. Účelem tohoto hnojení je zvýšit koncentraci živin nebo jejich nedostatku v půdě a hlavně v samotných rostlinách. Zároveň bylo zjištěno, že rostliny jsou schopny mnohem výrazněji reagovat na příjem nutričních látek právě prostřednictvím listů než v případě kořenů.

Účinky foliárního hnojení jsou velmi závislé na stavu rostliny, především tedy na voskovém povrchu listu. Kutikula je jen částečně propustná pro vodu a rozpuštěné živiny, proto může mít za následek limitování transportu látek do listů. Velkou roli zde hraje také doba, po kterou zůstávají živiny v rozpuštěném stavu na povrchu. Difúze může probíhat v případě, kdy nutriční látky jsou v kapalně formě, tedy roztoku. Ve vodě rozpustné látky jsou totiž schopny lepšího vstřebávání do listů než v případě pevných hnojiv, které se tak snadno neabsorbují do mezofylu listu.

Mechanismem foliárního příjmu nutrientů do listů se zabýval Seshadri Kannan ve své publikaci [40]. Ačkoli je již několik desítek let známý přístup živin a jiných nezbytně důležitých látek přes rostlinné kutikuly, kořeny a jiné nadzemní části rostlin, do roku 1980 nebyl mechanismus iontové absorpce listů respektive transportu aktivních látek do jiné části rostliny nijak podrobněji popsán. Stejně tak není dobře popsána translokace prvků z jednoho listu do listu druhého v různých fázích růstu rostlin.

Studium penetrace rozpuštěných látek přes kutikuly bylo usnadněno přítomností močoviny a zvýšením výskytu iontů v tomto tenkém materiálu [40]. Haas a Schönher [41] uvádějí, že přístup vody u různých rostlinných kutikulárních membrán jsou určeny rozpustnými lipidy obsaženými v membránách na povrchu rostliny a vlastností propustnosti vody se mění se stářím listu. Pokud kutikulární průnik iontů je pasivní v neporušeném listě, měla by cestu následovat jako voda, jednoduše jde o difúzi. Vzhledem k tomu, že prostupnost vody závisí na složení rozpustných lipidů v pokožce, pronikání anorganických iontů a organických látek může být upraveno právě jimi.

V referenci [42] je velmi podrobně vystižen mechanismus a charakterizace funkce rostlinných kutikul. Další práce [43] se zabývá transportními procesy, přesněji difúzi vody přes tenké bariéry rostlin.

3.2.3 Listová kutikula – hlavní bariérová vrstva při foliárním hnojení

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, avšak pro naše další uplatnění postačuje, že je list tvořen *svrchní pokožkou (adaxiální kutikula), dužninou s cévními svazky a spodní pokožkou s průduchy (abaxiální kutikula)*.

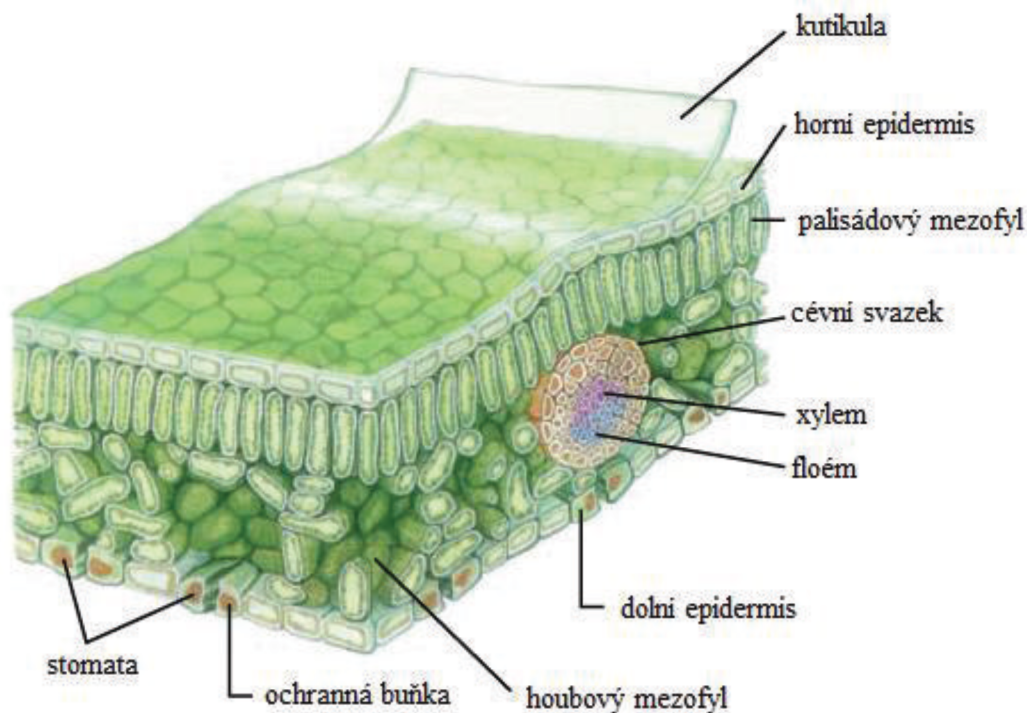
Struktura listu

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 [44]. Struktura listu je zachycena na Obr. 9.

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

Houbový parenchym je z pravidla tvořen buňkami různých tvarů obsahující velké interceluláry, které jsou propojeny s průduchovými dutinami. Houbový parenchym neobsahuje chloroplasty, proto je jeho hlavní funkcí tzv. *transpirace*. Z těchto důvodů je spodní část listu vždy světlejší než svrchní [44].

Cévní svazky, které se podílí na tvorbě žilnatiny (*nervatur*), jsou převážně kolaterální (uzavřené) popř. bikolaterální (otevřené). Tyto svazky se v listech postupně rozvětvují a zjednodušují, dále se kolem nich nacházejí buď parenchymatické, nebo sklerenchymatické pochvy, které se podílejí na vyztužení čepelí. Z listu jsou cévní svazky uspořádány do polokruhu a tvoří tzv. *řapík* [44].



Obr. 9: Anatomie listu: a) svrchní pokožka, b) palisádový parenchym, c) houbový parenchym, d) spodní pokožka a e) cévní svazky [45].

Struktura rostlinné kutikuly

Na primární stavbě těla vyšších rostlin se podílejí následující čtyři typy pletiv: *meristematická, základní, krycí a vodivá*. Všechny tyto pletiva se skládají z charakteristických buněk (původ, tvar aj.) a plní více než jednu funkci [46]. Rostlinná pletiva jsou velmi složité komplexní systémy, které se dělí dle specifických vlastností. Vzhledem k tomu, že tato diplomová práce je zejména zaměřena na svrchní část povrchu rostlin, budeme se proto zabývat pletivy krycími. Tato pletiva jsou složené systémy jednoduchých struktur, které jsou organizovány do spolupracujících celků, někdy jsou označovány jako tzv. *kutikuly*.

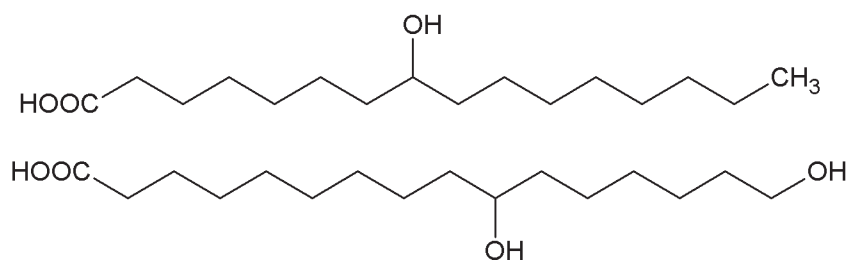
Pro život všech vyšších rostlin je nezbytný transport látek extracelulárními lipofilními bariérami, které tvoří rozhraní mezi vnějším okolím a vnitřním prostředím rostliny. Tyto kutikuly se dále podílí na řízeném průniku vody, rozpuštěných látek a plynů, zároveň je jejich cílem chránit rostliny před biotickými (hmyz, škůdci, houby, plísně aj.) a abiotickými (děšť, mráz, UV záření aj.) vlivy. Na základě podrobnějšího výzkumu bylo dále zjištěno, že kutikula je nezbytný orgán rostlin potřebný pro další důležité procesy v jejich těle a to např. v průběhu tzv. *organogeneze*, kde napomáhá k udržení oddělení orgánů.

Kutikula je přítomná na vnějším povrchu epidermálních buněčných stěn listů, primárních stonků, květů a plodů. Hlavní hydrofobní složkou rostlinného epidermu jsou nerozpustné polymery, cutin, cutan a vosky. Tato vrstva se na pohled jeví jako amorfni, ale pod mikroskopem byly pozorovány lamelární ultrastruktury [47].

Cutin a *suberin* jsou dva typy nerozpustných zoxidovaných polyesterů mastných kyselin a glycerolu, které jsou základními stavebními jednotkami těchto bariér. Cutin tvoří strukturní

složku těla rostlin a podílí se na tvorbě hydroizolační fólie, která poskytuje krycí schopnost primárním nadzemním rostlinným orgánům. Tato látka se tak podílí na struktuře jedné z největších biologických membrán vůbec. Zatímco cutin je složka nacházející se na vnější straně primární buněčné stěny, tak suberin se nachází na její vnitřní straně obvykle v blízkosti plazmatické membrány [47].

Cutin je makromolekula (polymer), který se skládá z mnoha dlouhých řetězců mastných kyselin, které jsou spolu pospojovány esterovými vazbami. Tyto struktury se účastní tvorby trojrozměrných sítí. Cutin je tvořen mastnými kyselinami obsahující hydroxylové a epoxidové skupiny, které se nachází buď ve středu, nebo na konci hlavního řetězce a na jeho opačném konci jsou navázány karboxylové skupiny (Obr. 10) [48].

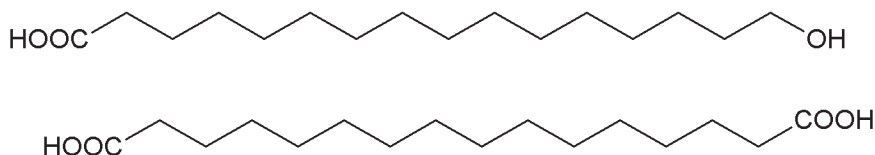


Obr. 10: Vzorec cutinu.

Cutin, jak již bylo zmíněno výše, je hlavní složkou vícevrstvé struktury na povrchu těla rostlin (*kutikuly*). Horní část pokožky je potažena tenkou vrstvou vosku, další vrstva je tvořená z cutinu, který se váže na vosky a tvoří tzv. *vlastní pokožku*. Spodní část bariéry je potažena cutinem spolu s vosky, které navíc obsahují směs pektinu, celulosy a jiných sacharidů. Tuto část pokožky nazýváme jako *kutikulární vrstva*. Na základě výzkumu bylo zjištěno, že rostlinná pokožka může nadále obsahovat kromě cutinu, také tzv. *cutan*. Cutan je další konstrukční polymer lipidového charakteru, který vznikl z uhlovodíků obsahující dlouhé řetězce [48].

Suberin byl vytvořen jako konstituční varianta vnitřních a vnějších buněk během jejich vývoje. Stejně jako cutin se i suberin podílí na tvorbě membrány, kde má funkci ochrany proti stresu z vnějšího prostředí a biologickému poškození. Ačkoli se oba tyto polymery odlišují ve svém chemickém složení a struktuře, plní stejnou funkci v ochraně rostlinných orgánů. Suberin je látka, která se usazuje ve stěnách podzemních orgánů rostlin např. hlízy, kořeny a v kořenovém endodermu. Materiál, který je založený na přechodu mezi suberinem a cutinem, je často uložen kolem svazku pochvy jednoděložných listů. Tento jev se děje pravděpodobně z důvodů zabránění nežádoucího uvolňování oxidu uhličitého během dekarboxylace [48].

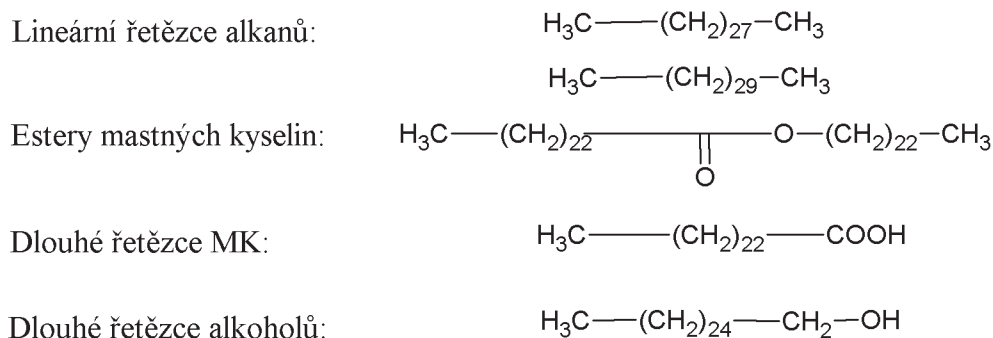
Suberin je stejně jako cutin tvořený z hydroxy nebo epoxy mastných kyselin, které jsou mezi sebou vázány esterovou vazbou. Významný rozdíl mezi cutinem a suberinem spočívá v jeho dalších funkčních skupinách, kdy suberin navíc obsahuje dikarboxylové a fenolické skupiny (Obr. 11).



Obr. 11: Vzorec *suberinu*.

Další složkou tvořící stavbu kutikuly jsou směsi chloroform-rozpustných kutikulárních a intracelulárních lipidů, které jsou souhrnně označovány jako *vosky*. Jedná se o směsi obsahující dlouhé acyl lipidy, které jsou extrémně hydrofobní. Nejčastější složkou tvořící strukturu vosků jsou alkyly s přímými řetězci, které obsahují 25 – 35 uhlíků. Funkční skupiny, které jsou také součástí skeletu vosků, jsou např. alkoholy, aldehydy, ketony, estery a volné mastné kyseliny (Obr. 12).

Vosky jsou syntetizovány přímo na buňky epidermu. Vosky tvořící vnější vrstvu kutikuly mohou často krystalizovat ve složité mikrostruktury, které napomáhají ke zvýšení drsnosti a hydrofobních vlastností povrchu rostlin. Drsnost povrchu rostlin zabraňuje shlukování kapek vody ve větší celky a naopak vzniklé kapky napomáhají k odstraňování nečistot a tak čištění povrchu rostlin [47].



Obr. 12: Mechanismus vzniku voskových látek.

Rostlinná kutikula je z hlediska své struktury mnohvrstevnou strukturou, která je tvořena *kutikulární vrstvou*, která je spojená s buněčnou stěnou. Tato vrstva obsahuje polymery, vosky a polysacharidy. Další částí je *vlastní kutikula*, která obsahuje cutin, intracelulární a epikulární vosky (Obr. 9). Tloušťka těchto vrstev a jejich složení závisí na druhu, anatomické stavbě, lokalizaci a vývojové fázi. Šířka rostlinných kutikul může dosahovat 0,1 – 14 μm a obsahovat více než 20 – 600 μg cutinu na 1 cm^2 [48].

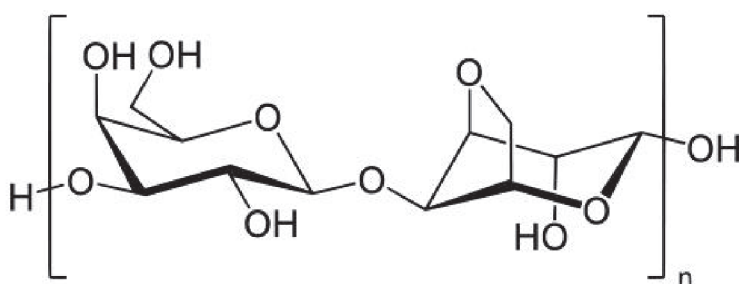
Stavba rostlinné kutikuly je popsána jako velmi složitá komplexní struktura, která má umožňovat transport látek mezi vnějším okolím a vnitřním prostředím listu a zároveň má chránit povrch rostliny. O bariéře takovýchto vlastností můžeme říct, že se jedná o téměř ideálně izolovaný systém znemožňující průchod jakýmkoli patogenům a nežádoucím látkám, avšak je tato vrstva zodpovědná za regulaci nárůstu a úbytku vody, což je zprostředkováno stomaty. Na základě těchto poznatků bylo možné studovat transport látek skrz rostlinné kutikuly.

3.3 Využití agarózových hydrogelů jako modelového difúzního média

3.3.1 Agaróza

Agar je rosolovitá látka, která se získává z mořských řas rodu *Floridiae* a *Gelidium* a byl objeven v 17. století v Japonsku. Tento materiál je tvořen z agarózy a agaropektinázy. Agaróza je námi využívaná látka pro přípravu podpůrných hydrogelových médií, a proto je vhodné ji věnovat jednu kapitolu. Agaróza je přírodní polysacharid tvořený lineárním polymerem galaktózy, který se vyznačuje vysokou schopností gelace.

Jedná se o lineární polysacharid složený z opakujících se jednotek agarobiosy, což je disacharid složený z D-galaktosových a 3,6-anhydro-L-galaktopyranosových podjednotek [49]. Její molekulová hmotnost se pohybuje okolo 120 000 Da. Struktura agarózy je ilustrována na Obr. 13.



Obr. 13: Struktura lineárního polysacharidu agarózy [50].

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 délek v závislosti na koncentraci agarózy.

Agaropektin je heterogenní směs menších molekul, které se vyskytují 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 se vyznačuje významnými vlastnostmi a to tzv. *gelovatěním*, neboť jen díky tomuto procesu je schopna vytvářet gelové trojrozměrné struktury. Tento polysacharid je velmi dobře rozpustný v horké vodě, např. agaróza s nízkou teplotou tání je schopná se rozpouštět při teplotě 85 °C. Z hlediska rozpustnosti ve studené vodě je agaróza nerozpustná. Tento polymerní materiál se využívá pro přípravu termoreverzibilních gelů. Při ochlazení roztoku agaru (v rozsahu teplot 30 – 40 °C) [51] dochází k tuhnutí a vytvoření polotuhé gelové látky [52]. Pokud by došlo k ohřátí tohoto materiálu nad teplotu tání, došlo by ke zpětnému převodu gelu na roztok.

Pokud je gel vystaven zahřívání a teplota dosáhne bodu tání, tedy dojde k převodu gelu na roztok, potom může být pozorována hysterezní křivka, protože křivka naměřená při procesu přeměny roztoku na gel, kdy je dosaženo bodu tuhnutí materiálu, pak tato křivka nekoresponduje s křivkou naměřenou při jeho tání.

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 resp. asociace dvoušroubovic je stabilizována vodíkovými můstky.

Z hlediska svých vlastností se agarózové gely chovají jako řada jiných gelů, které jsou podrobněji popsány v Kapitole 3.3.2. Gelací agarózy se zabývají i další reference [53], [54].

Agaróza nachází uplatnění v celé řadě oblastí včetně 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) [55], [56], 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 gely 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 biomedicině 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 se můžeme dočíst v odborných publikacích [57], [58], [59].

3.3.2 Příprava a vlastnosti hydrogelů

Pod pojmem *gel* se skrývá disperzní systém, který z hlediska své velikosti dispergovaných částic patří do oblasti koloidní chemie (1 – 500 nm). Disperzní systémy jsou tvořené ze dvou fází, první fázi nazýváme *disperzní prostředí* (dispergens) a druhá *disperzní podíl* (dispergum). Disperzní prostředí je fáze, která zaujímá většinu objemového podílu celého disperzního systému. Může být tvořen pevnými, kapalnými i plynnými látkami a stejně tak i disperzní podíl.

Trojrozměrná síť disperzního podílu gelu může vzniknout z lineárního polymeru nebo jeho roztoku, pokud dojde k vytvoření dostatečného počtu spojů mezi makromolekulami. Dle toho, jakým způsobem tyto spoje (*uzly*) vznikají, rozdělujeme gely na *kovalentně síťované gely* a *fyzikálně síťované gely* [60].

Mechanismy vzniku gelové struktury

Kovalentně 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 [61].

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 Waalových sil, polárních sil nebo vodíkových vazeb. Vznik těchto makromolekulárních struktur může být podmíněn asociací mezi jednotlivými řetězci, ke které může dojít snížením afinity k rozpouštědлу některých skupin nebo sekvencí například snížením teploty, zvýšením koncentrace polymeru nebo zhoršením kvality rozpouštědla [61].

Dalším případem přípravy fyzikálně síťovaných gelů je ochlazení roztoku amorfního polymeru pod kritickou rozpouštěcí teplotu, čímž dojde k rozdělení jednotlivých prostředí. Pokud

tento proces probíhá za určitých podmínek, pak vzniklý gel může obsahovat submikroskopické oblasti s krystalickou strukturou, které nazýváme jako *krystalicity*. Přejít mezi amorfni a krystalickou strukturou je spojitý [61].

Další možnou přípravou gelových systémů je *geometrické síťování*, kterým dochází k propletení řetězců v důsledku tepelného pohybu [61].

Unikátní vlastnosti gelů

Gely mají unikátní mechanické vlastnosti, protože ačkoli nejsou gely typickými tuhými látkami, přesto mají mechanické vlastnosti charakteristické pro pevné látky. Gel je totiž schopný odolávat tečnému napětí až do určité hodnoty (*hodnota 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* [60].

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 prostorech mezi sítěmi disperzního podílu téměř stejně rychle jako v odpovídajícím solu [21].

Difuzivita nízkomolekulárních látek v gelu 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 a ani tepelnými konvekcemi. Mechanické vlastnosti přitom umožňují jednoduchou manipulaci s gelem (ve srovnání např. s roztokem) a také přípravu vzorku o přesně definovaném tvaru a rozměrech, což je nezbytné pro korektní matematický popis studovaných difúzních procesů.

3.3.3 Experimentální studium a matematický popis difúzních procesů

Pod pojmem difúze rozumíme proces samovolného vyrovnávání koncentrací v prostředí s koncentračním gradientem. 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 jejich vyrovnání. Pro 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* [62].

Fickovy zákony

Difúzní procesy, jak již bylo uvedeno výše, jsou způsobeny neuspořádaným pohybem molekul, který se podílí také na tepelné konvekci. Souvislostmi mezi těmito dvěma ději se zabýval německý fyzik Adolf Eugene Fick, který jako první položil základ a elementárně popsal princip difúze. Tyto hypotézy se mu dařilo ověřit na základě experimentů, díky nimž vytvořil Fick matematický aparát popisující difúzní procesy. Teoretické předpoklady difúze v izotropních médiích vychází z toho, že celkový jednosměrný difúzní tok skrz jednotkovou plochu je přímo úměrný koncentračnímu gradientu dle rovnice (1), která se označuje jako *První Fickův zákon* (PFZ) [21]:

$$J_1 = A \cdot j_1 = A \cdot D_1 \cdot \frac{\partial c_1}{\partial x}, \quad (1)$$

kde symbol A představuje velikost plochy, přes kterou daná látka difunduje, symbol j_1 charakterizuje difúzní tok přes jednotkovou plochu, c_1 představuje molární koncentraci dané látky a symbol x je vzdálenost od rozhraní dvou prostředí. D_1 je *difúzní koeficient*, který charakterizuje míru mobility molekul v dané látce a často je označován také pod pojmem *difuzivita*. Jedná se o velmi důležitý parametr, díky němuž můžeme difúzní procesy porovnat, zároveň se jedná o rozměrovou veličinu, která nabývá jednotky $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Pro případ nestacionární difúze byl odvozen *Druhý Fickův zákon* (DFZ), který vyjadřuje časovou změnu koncentrace difundující látky při nestacionární difúzi. Tento zákon na rozdíl od toho předchozího uvažuje změnu koncentrace v závislosti na čase [60]. Pokud opět platí, že difúze probíhá pouze ve směru jedné osy (berme osu x), potom můžeme tuto rovnici zjednodušit na tvar:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}. \quad (2)$$

Řešení rovnice (2) je pro dané podmínky často velmi komplikované. Vzhledem k tomu, že existuje celá řada publikací zabývajících se problematikou transportu látek, byla vypracována databáze difúzních modelů, do které hojně přispěl britský fyzik a matematik John Crank [63].

Mezi nejjednodušší řešení difúzních procesů patří *model difúze skrz tenký film a difúze do nekonečně dlouhého média v jednom směru*, který můžeme nalézt také pod označením *volná difúze*. První model popisuje problematiku ustálené difúze a druhý model odpovídá neustálené difúzi.

Model neustálené difúze, který je aplikován v této práci pro studium penetrace komerčních huminových přípravků skrz rostlinné kutikuly, popisuje transportní proces, který začíná na rozhraní (kutikula/hydrogel) a částí difundují do „nekonečného“ prostoru a nemohou dosáhnout v měřeném čase jeho konce. Tímto médiem může být plyn, kapalina nebo i pevná látka. Na počátku obsahuje médium konstantní koncentraci látky 1, avšak náhlým zvýšením její koncentrace na rozhraní dojde ke vzniku koncentračního gradientu a látka začíná difundovat hlouběji do média. Tímto způsobem se může chovat systém, u něhož probíhá difúze přes tenký film.

Změna koncentrace na rozhraní způsobí vznik koncentračního profilu látky 1 v médiu, přičemž tento profil je závislý na čase. Cílem řešení problému je zjistit, jak se mění koncentrační profil difundující látky se změnou její koncentrace na rozhraní a s časem [64]. Řešení volné difúze lze získat z diferenciální rovnice (2) pro okrajové podmínky, které jsou uvedeny níže:

$t = 0$	všechna	$c_1 = c_{1\infty}$
$t > 0$	$x = 0$	$c_1 = c_{10}$
	$x = \infty$	$c_1 = c_{1\infty}$

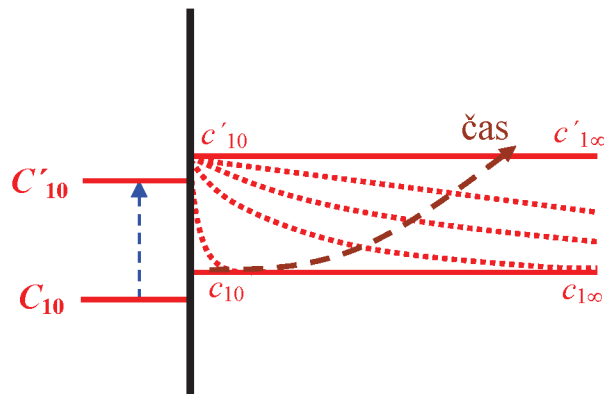
Pokud upravíme Fickův zákon, získáme rovnice (3) a (4)

$$\frac{c_1 - c_{10}}{c_{1\infty} - c_{10}} = \text{erf} \frac{x}{\sqrt{4D_1 t}}, \quad (3)$$

$$j = \sqrt{\frac{D_1}{\pi \cdot t}} \cdot (c_{10} - c_{1\infty}) \cdot \exp\left(-\frac{x^2}{4 \cdot D_1 \cdot t}\right), \quad (4)$$

kde c_1 je molární koncentrace difundující látky, c_{10} odpovídá rozdílu koncentrací na začátku a na konci procesu, $c_{1\infty}$ je původní koncentrace a t je doba, po kterou difúze probíhala.

Rovnice (4) charakterizuje difúzní tok volné difúze, která je funkcí plochy a času. Hodnota difúzního koeficientu pro difúzi skrz tenký film se mění přímo úměrně s difúzním tokem, tedy pokud dojde k zdvojnásobení hodnoty difúzního koeficientu, potom se i difúzní tok zvýší dvakrát, avšak v případě volné difúze je tomu jinak. Pokud dojde ke zvýšení hodnoty difúzního koeficientu dvakrát, potom difúzní tok nabývá hodnoty násobku druhé odmocniny ze dvou. Situace volné difúze je znázorněna na Obr. 14.



Obr. 14: Volná difúze [21].

Provedeme-li integraci rovnice (3) pro podmínky $x = 0$ mezi časy 0 a t , potom dostaneme

$$n_1 = \sqrt{\frac{4Dt}{\pi}} (c_{10} - c_{1\infty}), \quad (5)$$

Celkové množství látky n_1 přenesené přes rozhraní, které je funkcí odmocniny z času a pro jeho zdvojnásobení tedy musí být doba difúze čtyřnásobná. Čas potřebný pro dosažení určité koncentrace v daném místě, je úměrný druhé mocnině vzdálenosti od rozhraní a obrácené hodnotě difúzního koeficientu.

Stanovení difúzního koeficientu metodou nekonečného difúzního páru

Tato difúzní technika je vhodná pro stanovení difúzního koeficientu u látek pevného skupenství, neboť se jedná o dva vzorky, které mají různé koncentrace a látka tak difunduje z místa s vyšší koncentrací do místa s nižší koncentrací. Oba vzorky jsou na začátku experimentu k sobě připevněny a po uplynutí námi zvolené doby difúze jsou vzorky rozpojeny a proměřeny.

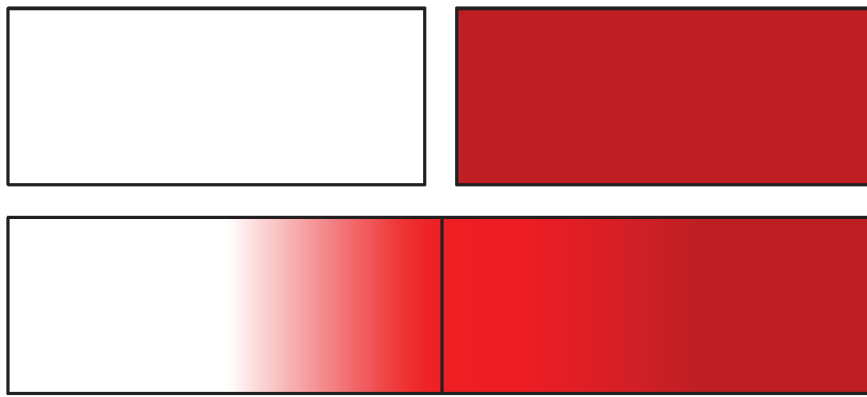
Z měření je totiž možné zjistit úbytek resp. nárůst koncentrace látky a to v různých polohách od rozhraní např. po 1 mm. Ze závislosti koncentrace difundující látky na vzdálenosti od rozhraní, získáme tvar koncentračního profilu, ze kterého můžeme numericky stanovit hodnotu difúzního koeficientu a to vztahem:

$$\frac{c_1 - \bar{c}_1}{c_{1\infty} - c_1} = \operatorname{erf} \frac{x}{\sqrt{4Dt}}, \quad (6)$$

$$n_1 = \sqrt{\frac{4Dt}{\pi}} (\bar{c}_1 - c_{1\infty}), \quad (7)$$

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 .

Metoda nekonečného difúzního páru je znázorněna na Obr. 15. Veškeré difúzní experimenty musí probíhat za konstantní teploty, nekonečný difúzní pár nevyjímaje, takže hned na samém začátku musí dojít k vytemperování vzorků a ustálení jejich teploty, protože difúze je na teplotě silně závislá.



Obr. 15: Stanovení difúzního koeficientu metodou nekonečného difúzního páru [63].

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Studium transportu nutričních či „jakýchkoli“ jiných látek do struktury listu je podmíněno průchodem přes rostlinnou kutikulu. Jedná se o tenký lipidický materiál na povrchu každé rostliny. Pokud tedy chceme studovat problematiku transportu látek *ex situ*, pak je v první řadě nutné získat tyto tenké bariérové membrány z povrchu listů vhodnou metodou izolace.

Na toto téma byla vypracována rešerše, která se zejména týká postupu přípravy listů a izolačních roztoků. Posléze byla také vypracována rešerše týkající se foliárního typu hnojení jeho funkce, mechanismu a transportu nutričních látek do struktury listu přes rostlinné kutikuly, která má za následek zlepšení kvality a růstu rostlin popř. i samotných plodů.

4.1 Metody izolace rostlinných kutikul

4.1.1 Enzymatická metoda izolace

Metoda dle W. H. Orgella

Autoři reference [65] se zabývali jednou z nejšetrnějších metod izolace rostlinných kutikul vůbec. Tuto metodu nazýváme jako enzymatickou, neboť využívá enzymu pektinázy a celulózy, jakožto biologicky aktivních látek umožňujících rozklad mezofylu.

Tato metoda je založena na izolaci kutikul z disků o průměru 1,8 cm, vyražených z čerstvých listů. Takto připravené vzorky listů byly zality 2 cm³ 0,1 M acetátového pufru o pH v rozmezí 3,5 až 4,5. Do tohoto roztoku byl dále přidán enzym pektináza, která zde byla v zastoupení 2 až 3 hm. % a na závěr bylo do roztoku přidáno 100 ppm Merthiolatu, který zde sloužil jako činidlo zabráňující růstu mikroorganismů (plísně).

Vzhledem k tomu, že listy mají tendenci stoupat k hladině roztoku, musely být zatíženy drátěnou síťkou. Pro podpoření vstřebávání enzymů do listu bylo využito přerušovaného vakua a rotační třepačky (100 ot./min), která urychlovala rozklad mezofylu. Na základě zkušeností, byla podpořena funkce enzymů temperováním vzorku na teplotu 35 °C, aby tak bylo docíleno prostupu enzymů nejen na okrajových částech listu.

Po uplynutí doby rozkladu mezofylu, byla provedena separace kutikul, které byly vneseny i se sítí do nádoby s vodou, kde došlo po několika omytí k odplavení odumřelých pletiv a na síti zůstaly pouze čisté kutikuly. Ty byly přeneseny do nádoby s vodou obsahující opět 100 ppm Merthiolatu.

Pro tento typ experimentu byly využity dva druhy enzymů tzv. enzym 19 a pektináza, která se nakonec ukázala jako lepší volba. Její výhodnější vlastnosti spočívaly nejen v tom, že efektivněji odstraňovala buněčný obsah listů, ale zároveň byla mnohem rychlejší, což je pro experimenty, které se opakují v určitých časových intervalech velmi důležité.

Orgell [65] provedl izolaci kutikul z listů různých druhů rostlin a zjistil, že kutikuly lze získávat různou rychlostí. Například rostliny *Convolvulus arvensis*, *Peperomia sp.*, *Philodendron sp.* nebo *Vinca major*, jsou schopny průniku enzymů v mnohem kratším čase, a to po 3 až 12 hodinách. Naopak v případě typů rostlin *Citrus sp.*, *Coprosma sp.*, *Nicotina glauca*, *Prunus armeniaca* a *Persica* 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, plísň nebo povětrnostní podmínky či sluneční záření. Z jeho pozorování bylo totiž zjištěno, že starší listy sebou nesou řadu nevýhod 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. Schreiber a J. Schönherr

Touto metodou izolace rostlinných kutikul se zabývali vědci Schreiber a Schönherr v publikaci [66]. Jejich práce je zaměřena na transport vody a rozpuštěných látek přes kutikuly rostlin. V první řadě se zabývali izolacemi, které probíhaly stejným způsobem, jako tomu je popsáno v práci [65], ale na základě vlastních experimentů tuto metodu později upravili, zjednodušili a doplnili o vlastní výsledky a pozorování.

Z plně vyvinutých mladých listů figy byly korkovrtem vyraženy kruhy o průměru 1,5 cm. Dále byl připraven izolační roztok z 0,1 M pufru, který obsahoval kyselinu citrónovou a citrát sodný a jeho pH bylo upraveno na hodnotu pohybující se v intervalu 3 – 4. Tato hodnota pH je totiž neoptimálnější pro funkci enzymů.

K takto připravenému roztoku byl přidán azid sodný a to tak, aby výsledná koncentrace roztoku dosahovala 0,001 M. Azid sodný zde vystupuje jako konzervační činidlo zabírající růstu mikroorganismů a tedy znehodnocení vzorků. Do takto připraveného izolačního média byla přidána pektináza a to v zastoupení 1 – 2 hm. %. Experimentálně bylo zjištěno, že pro dosažení stejných výsledků naprosto postačuje pektináza, která se používá na ovoce a ve vinařském průmyslu. Tento typ enzymů je totiž méně nákladný než v případě pektinázy houbového původu. S přibývajícimi experimenty však bylo dosaženo nového poznatku z hlediska působení enzymů a to využití kombinace pektinázy a celulázy, které je zase podstatně levnější a tedy se tato metoda stává ještě víc ekonomicky výhodnější.

Častým problémem bývá neschopnost průniku enzymů až ke středu listu, v tomto případě je nutné penetraci podpořit prostřednictvím přerušovaného vakua. Pokud není do experimentu zahrnuté vakuum, potom může dojít k prodloužení izolace až o několik týdnů. Pro zvýšení funkce enzymů a jejich schopnost permeability do středu listů, můžeme opět využít teploty nádoby, ve které jsou listy uloženy a to na teplotu v rozsahu 30 – 40 °C.

Tyto experimenty probíhaly po dobu 20 dní, kdy výsledkem byl tmavě hnědý roztok, ve které se nacházely kutikuly, které bylo možné přemístit do nádoby s deionizovanou vodou, která dopomohla k úplnému odstranění buněčných zbytků z povrchu těchto porézních membrán.

4.1.2 Chemická metoda izolace

Mnohem drastičtější metodou izolace rostlinných kutikul se zabýval Edgington ve své práci [67], která je zaměřena na transkutikulární permeabilitu fungicidů. Postup přípravy listů je obdobný jako v případě enzymatické cesty, z listů byly vyraženy disky o průměru 1,3 cm. Experimenty byly prováděny na kakaových listech, kde před samotnou izolací byly listy rozlišeny černou fixou na abaxiální a adaxiální stranu. Na základě experimentů bylo totiž zjištěno,

že abaxiální strana listu resp. kutikuly se stomaty, je schopna rychlejšího průniku látek než v případě adaxiálních kutikul.

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

Kutikuly byly poté podrobeny mikroskopování, aby byl zjištěn jejich stav, neboť i sebe-menší poškození má velký vliv na difúzní experimenty a zároveň by touto metodou mohly být rozděleny na horní a dolní. Přitom veškeré manipulace s tímto tenkým materiálem byly prováděny rychle, protože zde hrozí dehydratace, která může způsobit jejich nevratné poškození [67].

Obdobného procesu izolace využil Edgington a Solel v letech 1972 – 73 [68] a [69], kdy byly nejdříve vyraženy listy z disků o průměru 1,0 cm. Tyto listy 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 doby byly kutikuly ponořeny do čisté vody, z níž byly získány čiré kutikuly [69].

4.2 Studium transportu kapalných látek přes rostlinné kutikuly

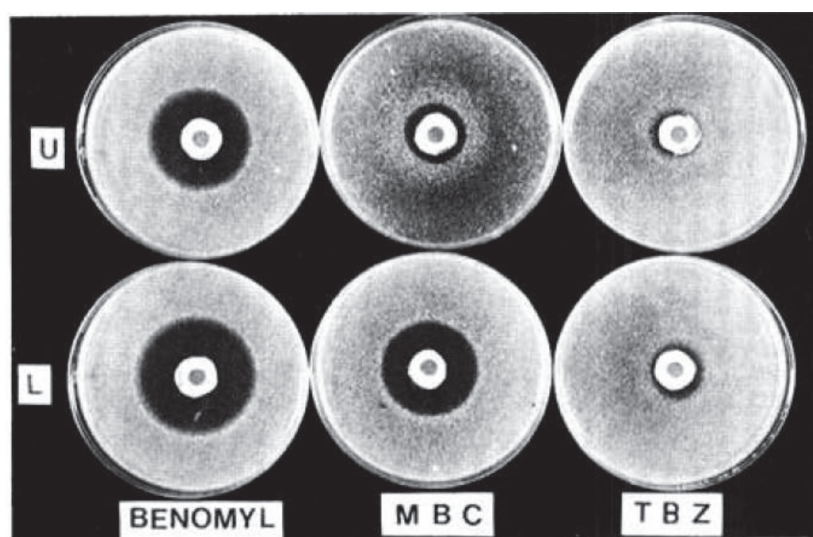
Studiem bariérových vlastností a charakteru voskových kutikul se zabývají v referenci [70], kde penetrace hydrofilních a hydrofobních sloučenin skrz izolované rostlinné kutikuly byly zkoumány v uzavřeném difúzním systému (kutikula/agar). Kutikuly, které byly pro tyto experimenty vybrány, reprezentují dva typy mikrostruktur, které jsou charakterizovány lamelární či retikulární zónou. Transport látek byl studován pro glyfosfáty a isoproturonu. Penetrace glyfosfátu byly velmi nízké, naopak difúze isoproturonu byla mnohem rozsáhlejší, a to zejména u rostlinných druhů pepře a rajčat [70].

V referenci [71] si také uvědomují důležitosti penetrace aktivních látek do listů, neboť tato schopnost příjmu nutričních látek hraje velmi důležitou roli v systémových aktivitách rostlin. Efekt povrchových a kapalných hnojiv na transport fungicidů byl studován na modelu, který obsahoval kutikuly z rostliny *Bryophyllum calycinum*. Roztoky fungicidů byly poté rovnou pipetovány na vzorek kutikuly, která byla položena na agarózový hydrogel, jehož součástí byla přítomnost výtrusů typu *Cladosporium cladosporioides*. Po době penetrace bylo provedeno měření průměrů inhibičních zón. Velikost těchto zón byla studována fungicidy, které byly pipetovány zvlášť na kutikulu a zvlášť na agarózový gel. 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.

Tato metoda studia transportu spočívala v přípravě agarózového gelu o pH 6,5, který byl nalit do čisté petriho misky, kde byl ponechán ke zchladnutí. Na připravený hydrogel byla položena kutikula, na niž byl aplikován fungicidní přípravek prostřednictvím mikropipety. petriho miska byla uzavřena víkem a celý systém byl ponechán k penetraci. Takto připravený difúzní proces byl průběžně měřen po dobu 3 dnů, kdy byly zaznamenávány inhibiční zóny

vzniklé při průniku. Závěr z celého experimentu týkající se kombinací aditivních látek a fungicidů a zhodnocení výsledků změření je podrobněji popsán v referenci [71].

Transkutikulárním pohybem fungicidů přes rostlinné kutikuly se také zabývaly v práci [68]. Tyto experimenty zaměřené na difúzi látky přes vnější stranu listové bariéry byla provedena na základě vyizolovaných rostlinných kutikul z listů *Malus sylvestris*, které byly položeny na gel připraveného z bramborové dextrózy. Transport látek probíhal po dobu 24 hodin, kdy bylo zjištěno, že efektivnějšího prostupu látek jsou schopny abaxiální kutikuly než kutikuly adaxiální. Dále bylo porovnáno několik typů těchto fungicidních látek, čímž byla prozkoumána jejich schopnost průniku. Systém pro studium těchto experimentů je uveden na Obr. 16.



Obr. 16: Inhibiční zóny po 24 hod penetraci fungicidů pro adaxiální (U) a abaxiální (L) kutikuly podle reference [68].

4.3 Studium porozity hydrogelových systémů

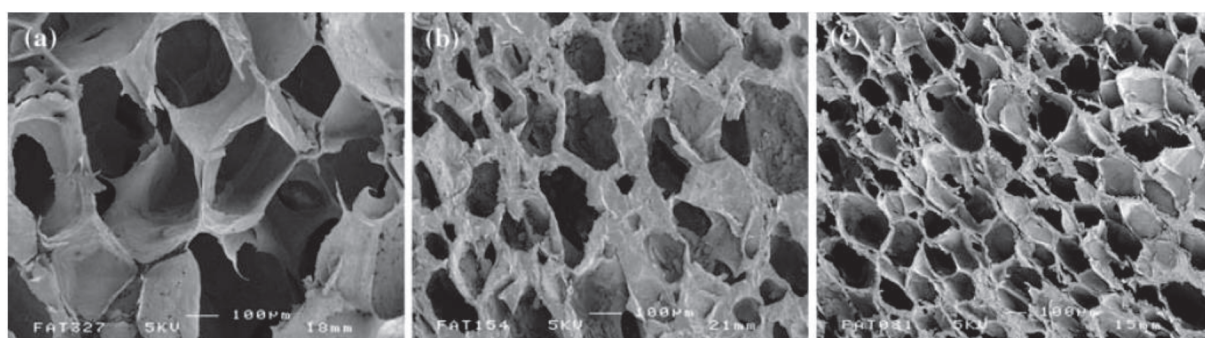
Pro zjištění a kontrolu porézních struktur a dalších vlastností hydrogelových systémů se velmi často využívá rtuťová porozimetrie (angl. *mercury intrusion porosimetry* – MIP) doprovázená s tzv. skenovací elektronovou mikroskopií (SEM). Obě tyto metody poskytují podrobné zaznamenání parametrů a zobrazení struktur materiálů, které jsou velkým přínosem pro následné aplikace materiálů do praxe či získání potřebných kritérií pro vyhodnocování experimentů.

Autoři práce [72] se zabývaly přípravou a charakterizací porézních alginátových hydrogelů. Jejich porézní materiály byly syntetizovány tzv. *micelovým templátováním* (MT) a následnou gelací. Vzniklá porézní mikrostruktura byla podrobena měření na rtuťovém porozimetru, na skenovacím elektronovém mikroskopu a některými dalšími technikami. Tyto struktury byly následně navrženy jako potenciální scaffoldy pro oblast tkáňového inženýrství.

Alginát patří mezi atraktivní přírodní biomateriály, které se vyznačují svojí kompatibilitou, nízkou toxicitou a gelací s kovovými kationty. Tato práce se zabývá přípravou hydrogelů procesem zvaným *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.

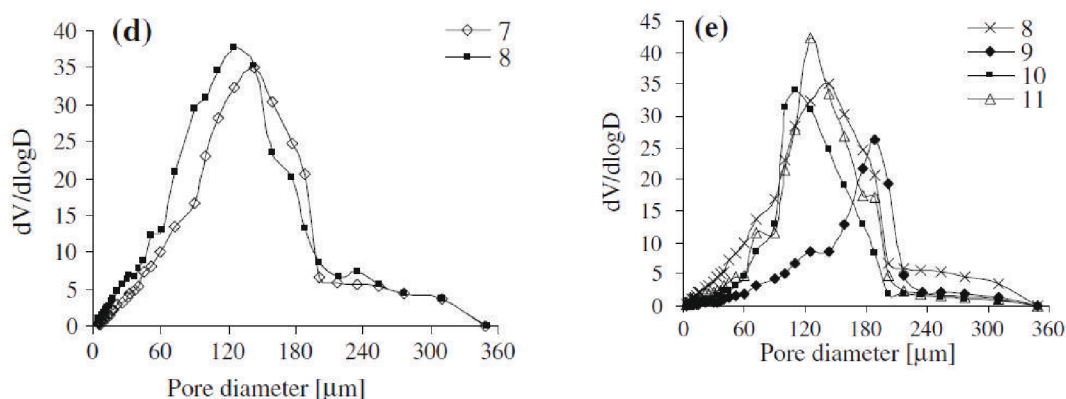
V první řadě byly alginátové hydrogely podrobeny analýze na skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM). Nejdříve byl vzorek podroben lyofilizaci v prostředí kapalného dusíku po dobu 5 minut. Tyto struktury byly ostrou žiletkou rozřezány na malé fragmenty, a poté byly upevněny na hliníkový čep černou karbonovou pastou. Vzorky byly před analýzou potaženy zlatem a následně byly analyzovány na SEM [72]. Dále byly vzorky podrobeny rtuťové porozimetrii (MIP). Tyto experimenty probíhaly při nízkých tlacích (0–45 PSI), které umožnily získat distribuce pórů, které se pohybovaly v rozmezí 1–360 μm [72].

SEM a MIP byly využity pro objasnění mikrostruktury templátové pěny. SEM ukazuje, že póry vzorků, které byly připravené micelárním templátováním jsou poměrně jednotné jak svým tvarem, tak velikostí a jsou zorganizovány uspořádaným způsobem. Snímky ze SEM zobrazují, že tyto vzorky vykazují prodloužené struktury pórů, což je zřejmé ze snímků (Obr. 17). Dále je z fotografií patrné, jak se se zvyšující koncentrací aktivní látky zmenšují a uzavírají póry.



Obr. 17: Snímky hydrogelů připravovaných micelárním templátováním s různým obsahem koncentrace CTAB. (a) 0,04 M, (b) 0,2 M (c) 0,3 M [72].

MIP metoda ukazuje, že hydrogely připravené MT metodou vedou ke vzniku vysoce porézních struktur, procentuální zastoupení těchto pórů se pohybuje okolo 83–97 %. Jde o uniformní a monodisperzní póry, jejichž distribuce velikostí se pohybuje v rozmezí 32,5–164,0 μm .



Obr. 18: Data z MIP pro hydrogely připravované micelárním templátováním a gelací za použití různých koncentrací CTAB [72].

Distribuce velikosti pórů byla stanovena pro MT hydrogely, které byly připraveny 0,01 M CTAB. Nízkou koncentrací povrchově aktivní látky dochází ke vzniku otevřených, vnitřně

propojených a mírně protáhlých pórů s vysokým totálním objemem a většími velikostmi pórů, což je patrné z grafu (Obr. 18).

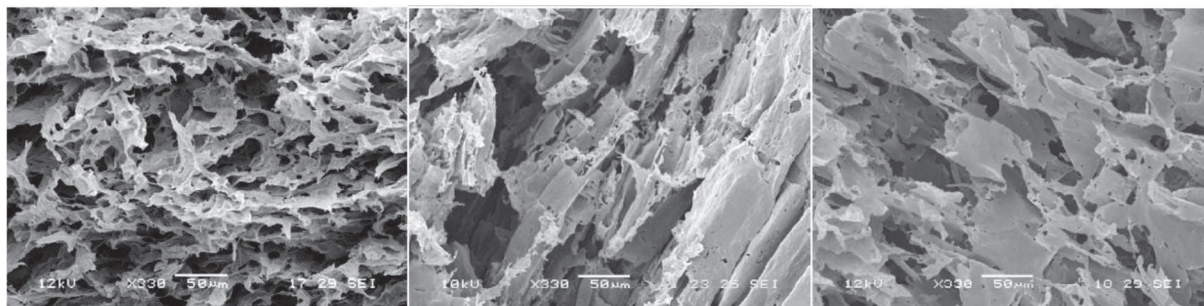
Dále bylo zjištěno, že při nižších koncentracích CTAB může docházet ke vzniku trubkovitých pórů. Proto tyto experimenty byly realizovány ve směsi s bromidem draselným, dle práce [72]. Ve výsledku však k žádným významným změnám nedošlo, o čemž vypovídá i graf (Obr. 18 e).

Vzorky, které byly připravovány z CTAB o koncentraci 0,3 M, se vyznačovaly porézní sítí s uzavřenými a menšími póry s užší distribucí velikostí pórů. Při těchto studiích byly pozorovány distribuce pórů pro vzorky připravované při 35 a 50 °C.

Autoři práce [73] se také zabývali hydrogely, které by mohly sloužit jako scaffoldy pro tkáňové inženýrství. Jedná se o materiály na bázi polyvinylalkoholu, které jsou 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 na 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 provedené pomocí SEM mikroskopie byly snímky, které zaznamenaly strukturu čistých PVA hydrogelů a PVA materiálů s obsahem příměsí kyseliny hyaluronové, dextranu apod. Snímky znázorňují nepravidelné struktury pórů (Obr. 19).



Obr. 19: Snímky struktury PVA hydrogelů a jejich modifikací [73].

U těchto vzorků byla dále provedena analýza velikosti pórů, kdy na základě těchto naměřených hodnot byly stanoveny distribuce objemů pórů a to pro čistý PVA hydrogel a dextran/PVA hydrogel.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

A) *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
celulóza	p.a.	Sigma-Aldrich
azid sodný	p.a.	Sigma-Aldrich

B) *Chemická metoda izolace rostlinných kutikul*

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

C) *Příprava hydrogelů*

chemikálie	čistota	výrobce
lignohumát		Amagro s.r.o
agaróza	p.a.	Sigma-Aldrich

5.2 Použitá instrumentace a další zařízení

UV-VIS spektrometr Varian, Cary 50

optický mikroskop Olympus IX71

optický mikroskop Nikon Eclips Ci

fluorescenční mikroskop MicroTime 200 (PicoQuant)

mechanický profilometr DEKTA kXT (Bruker)

pH metr WTW pH 330

reometr AR-G2 TA Instruments, Inc.

rtuťový porozimetr Poromaster 60 (Quantachrome)

skenovací elektronový mikroskop ZEISS EVO LS 10

stereomikroskop Nova 2200 (Quantachrome)

vícemístná míchačka Poly 15

5.3 Separace rostlinných kutikul z listů

Pro studium penetrace komerčně dostupného humátu bylo nutné v první řadě provést izolaci rostlinných kutikul z listů. Tyto izolace byly provedeny na základě vypracované rešerše (Kapitola 4.1), avšak na základě zkušeností a získaných poznatků z řešení této problematiky byl použitý materiál a postup izolace modifikován.

Izolace rostlinných kutikul byly prováděny z listu *Prunus laurocerasus* (česky Bobkovišeň lékařská). Tato rostlina byla vybrána záměrně, vzhledem k tomu, že její listy jsou poměrně tvrdé, silné a jejich kutikuly mají vynikající mechanické vlastnosti. O této skutečnosti jsme se přesvědčili již před 2 lety, kdy na téma izolace rostlinných kutikul a transportu huminových látek byla vypracována bakalářská práce [74]. Na základě získaných zkušeností a znalostí byl zvolen tento druh listu (Obr. 20).



Obr. 20: Detail listu rostliny *Prunus laurocerasus*.

Separace kutikul byla prováděna pouze z mladých listů, které se vyznačují světle zeleným zbarvením (Obr. 20 – červené označení). Tyto listy totiž nejsou dostatečně dlouhou dobu vystaveny nežádoucím vlivům, které by je mohly poškodit, což by se později podepsalo na transportu studované látky.

5.4 Enzymatická metoda separace kutikul

Enzymatická metoda izolace (EMI) rostlinných kutikula byla provedena na základě nabytých informací [65], [66]. Avšak náš postup izolace listového epidermu byl opět modifikován.

V první řadě byly listy z rostliny *Prunus laurocerasus* připraveny na izolaci. Nejdříve byly ponořeny do kádinky s destilovanou vodou, aby došlo k odstranění nečistot. Poté byly jejich okrajové části a hlavní žíla s řápkem odstraněny pomocí skalpelu (Obr. 21).

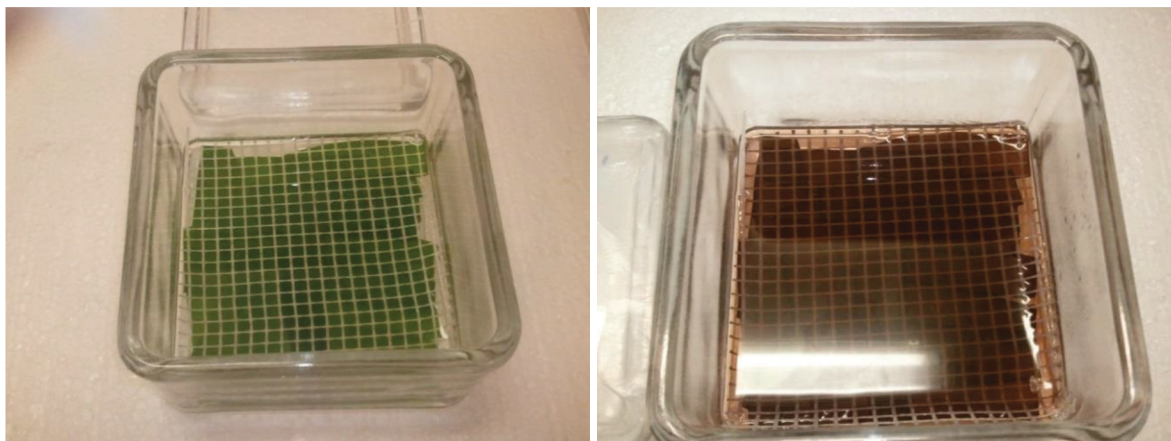
Druhým krokem byla příprava izolačního roztoku, který obsahoval 0,2 M citrátový pufr. V 1 dm³ destilované vody bylo rozpuštěno 3,1 g kyseliny citrónové a 1,5 g citrátu sodného, kdy pH roztoku bylo upraveno dle potřeby na hodnotu 3,5. Ze zásobního roztoku pufru bylo odměřeno 45 ml, k čemuž bylo přidáno 5 g pektinázy a 5 cm³ azidu sodného, který zde sloužil

místo streptomycinu jako látka zabraňující růstu nežádoucích mikroorganismů. Na základě zkušeností byly enzymy pektinázy a celulázy smíchány v poměru 1:1 (finančně výhodnější).



Obr. 21: Příprava listů na izolaci: omytí destilovanou vodou (vlevo), ořezané listy (vpravo).

Do čisté nádoby byly vloženy připravené listy, které byly přichyceny umělohmotnou síťkou (Obr. 22 – vlevo). Ta zabraňovala vyplavení listů a umožnila tak jejich dokonalé pokrytí roztokem. Poté byl do nádoby nalit připravený izolační roztok a nádoba byla navíc utěsněna parafilmem, který bránil odpařování roztoku, neboť celý proces izolace tohoto typu trval po dobu 6 týdnů.



*Obr. 22: Příprava listů *Prunus laurocerasus* na izolaci kutikul (vlevo), vizuální pohled na izolační roztok před separací kutikul (vpravo).*

Po uplynutí požadované doby izolace (Obr. 22 – vpravo) byly listy přeneseny do nádoby s destilovanou vodou, kde proběhla separace kutikul. Pro odstranění tenké bariéry z listu bylo využito umělohmotné pinzety, aby bylo eliminováno možné poškození kutikul a dále štětce, kterým byl jemně odstraněn degradovaný mezofyl. Výsledkem byl vznik světle hnědých čistých tenkých membrán (Obr. 23), které tak byly připraveny pro transportní experimenty a další studie.



Obr. 23: Rostlinné kutikuly izolované enzymatickou metodou.

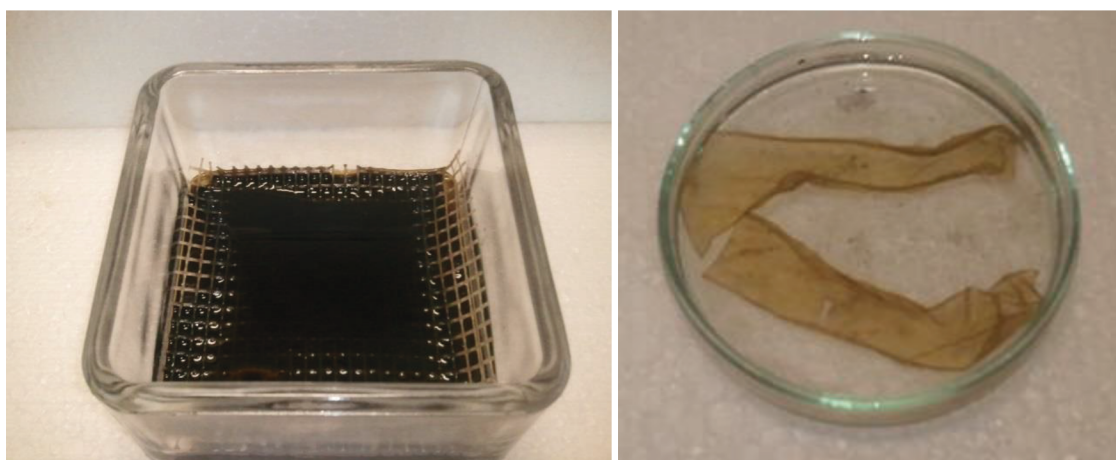
5.4.1 Chemická metoda separace kutikul

Postup chemická metody izolace (CHMI) byl proveden na základě vypracované literární rešerše [67], [68] a [69], avšak i v tomto případě byla metoda upravena, aby nebyla tak ekonomicky nákladná.

V první řadě byly připraveny listy *Prunus laurocerasus*, které byly ponořeny do kádinky s destilovanou vodou, jak je tomu na Obr. 21 – vlevo. Poté byly odstraněny krajní části listu a hlavní žíla s řápkem pomocí skalpelu. Tím bylo zamezeno možného poškození kutikul, při jejich separaci.

Následně byl připraven izolační roztok, který obsahoval 60 hm. % chlorid zinečnatý rozpuštěný v koncentrované kyselině chlorovodíkové. Bylo odváženo 17,7 g $ZnCl_2$, který byl rozpuštěn v 10 cm³ koncentrované HCl. Při rozpouštění chloridu zinečnatého je nutné dbát zvýšené opatrnosti, protože tato reakce je silně exotermního charakteru.

Do čisté nádoby byly vloženy připravené listy, které byly opět přichyceny umělohmotnou mřížkou. Listy byly překryty roztokem, a poté bylo víko nádoby obaleno parafilmem, aby nedocházelo k odpařování roztoku. Listy byly ponechány k izolaci po dobu 3 dnů (Obr. 24 – vlevo).



Obr. 24: Izolační roztok s listy před separací (vlevo), rostlinné kutikuly izolované chemickou metodou (vpravo).

Po uplynutí požadované doby izolace byly listy převedeny do nádoby s destilovanou vodou, kde došlo k jejich separaci. V první řadě byla sejmuta svrchní kutikula umělohmotnou pinzetou a odumřelé zbytky rostlinných pletiv byly následně odstraněny pomocí štětce. Výsledkem byl vznik světle hnědých čistých kutikul (Obr. 24 – vpravo).

5.5 Charakterizace používaných materiálů

5.5.1 Charakterizace rostlinných kutikul

Tato kapitola je věnována charakterizaci používaných materiálů, tedy jak rostlinných kutikul, tak také agarózových hydrogelů, které byly podrobeny analýze řadou specifických metod. Rostlinné membrány byly zkoumány pod optickým, fluorescenčním mikroskopem a jejich povrchová textura a tloušťka byla stanovena profilometrií. Hydrogely využitě jakožto modelová difúzní média, byly podrobeny reologickým zkouškám pro charakterizaci jejich základních mechanických vlastností a dále také skenovací elektronové mikroskopii, stereomikroskopii a na závěr rtuťové porozimetrii pro základní popis jejich vnitřní struktury.

Optická mikroskopie kutikul

Tato metoda byla využita pro studium rostlinných kutikul těsně po jejich izolaci. Aby bylo možné s těmito materiály pracovat, v první řadě bylo nutné je rozdělit na adaxiální a abaxiální stranu, načež bylo využito optického mikroskopu Nikon Eclips Ci. Ten nám umožnil pořídit snímky jednotlivých kutikul a zároveň díky softwaru uEyeCockpit mohly být stanoveny průměry stomat na spodních kutikulách. Celé měření probíhalo při 20-ti násobném zvětšení a rozlišení obrazu 1 280 × 1 024 pixelů.

Tato studie nám měla pomoci objasnit rozdíly ve strukturách adaxiálních a abaxiálních stran kutikul. V případě, že by se prokázaly nějaké výraznější rozdíly mezi jednotlivými typy membrán, mohlo by to mít vliv na bariérové vlastnosti. Na základě dosavadních zkušeností bylo zjištěno, že penetrace látek přes spodní a svrchní kutikulu má také odlišnou tendenci (Kapitola 6.3.1). Z těchto důvodů bylo nutné tyto kutikuly vzájemně porovnat a posoudit jejich odlišnosti ve struktuře.

Kutikuly byly pozorovány hned po separaci, tedy po odstranění mezofylu, a poté v pravidelných časových intervalech. Bylo totiž nutné stanovit, jestli nedochází k příliš rychlé degradaci struktur přítomných v kutikulách. Dále byly kutikuly studovány pod mikroskopem také v průběhu difúzních experimentů (Kapitola 6.2.1), protože bylo nutné zjistit, jestli nedochází ke vzniku nějakých anomálií na těchto bariérách již během působení lignohumátu (LH).

Fluorescenční mikroskopie kutikul

Fluorescenční mikroskop (FCS) je v podstatě optický mikroskop, který využívá fluorescenci k zobrazení organických i anorganických struktur.

Kutikuly byly studovány na FCS mikroskopu (s fluorescenční korelační spektroskopií) typu MicroTime 200 (Příloha 1). Díky těmto mikroskopickým studiím bylo možné zaznamenat doby života fluorescence částic přítomných v kutikulách, které byly studovány ihned po izolaci a po 12 dnech od izolace. Doba života fluorescence je citlivá na fyzikálně-chemické změny stavu fluoreskující skupiny, tudíž nám umožňuje pozorovat například vazbu sledované

látky na různé struktury v buňce. V našem případě byly pozorovány změny dob života fluorescence kutikul způsobené účinkem 1 hm. % roztoku lignohumátu.

Díky programu SymPhoTime bylo možné získat distribuční křivky dob života funkčních skupin u chemicky (CHIK) a enzymaticky izolovaných kutikul (EIK). Dále byla pozorována změna této distribuční křivky s časem stárnutí vzorků. Kutikuly byly podrobeny mikroskopování při působení 1 hm. % roztoku lignohumátu a to v časových intervalech 1, 2 a 3 dny. Naměřená data pro CHIK a EIK byly mezi sebou porovnány a dále díky těmto experimentům bylo možné sledovat degradační proces kutikul.

Celé měření bylo realizováno při excitaci 510 nm. Poměr z maximálního výkonu byl nastaven na 64 % a vlnová délka laseru, který působil na daný vzorek, odpovídala 507 nm. Intenzita fluorescence, která znázorňuje počet excitovaných fotonů za sekundu, se pohybovala v řádech 10^5 . Použitá optika umožňovala 20-ti násobné zvětšení vzorku a rozlišení FCS mikroskopu bylo $1\,376 \times 1\,038$ pixelů.

Pro tato měření bylo nutné využívat také optického mikroskopu Olympus IX71, kterým bylo možné snadno zjistit polohu a zaostření vzorku. Název programu, který umožňuje online náhled na vzorek přes černobílou kameru a tedy rychlé zorientování se ve vzorku, je Cell-SensEntry. Tímto způsobem mohlo dojít k rychlému nastavení vzorku a jeho dalšího snímání, k čemuž již posloužil výše zmíněný program SymPhoTime.

Profilometrie rostlinných kutikul

Profilometrie je jeden ze způsobů analýzy morfologie povrchu. Profilometrem jsme schopni stanovit tloušťku studované vrstvy a také její drsnost. Vertikální rozlišení se obvykle pohybuje v řádech nanometrů, horizontální bývá zpravidla o něco menší (20 nm – 25 μ m). Toto nastavení závisí od rozměrů *stylusu* (hrotu profilometru) a nastavení parametrů měření.

Tloušťka studovaných kutikul byla stanovena na mechanickém profilometru typu DEKTA kXT od společnosti Bruker. Měření bylo nastaveno pomocí programu VISION64, kde hodnota přitlaku stylusu odpovídala 3 mg, ostatní parametry byly nastaveny automaticky.

5.5.2 Charakterizace agarózových hydrogelů

Jako modelové médium pro difúzní experimenty (Kapitola 5.6) byly využity agarózové hydrogely, jakožto výborná difúzní média. Tyto materiály se vyznačují unikátními vlastnostmi, protože na rozdíl od vodných prostředí se u nich zanedbává tepelná konvekce, difuzivita a řada dalších nežádoucích vlivů. Tento typ hydrogelů se využívá z hlediska jeho schopnosti simulovat prostředí, které je tomu přírodnímu velmi blízké.

Reologie agarózových hydrogelů

Charakterizace hydrogelových systémů byla provedena na reometru, rtuťovém porozimetru, skenovacím elektronovém mikroskopu a stereomikroskopu. Reologie je metoda, která charakterizuje mechanické vlastnosti materiálů a napomáhá tak zjišťovat jejich viskoelastické vlastnosti a to za pomoci rotačních a oscilačních testů.

Pro posouzení mechanických vlastností agarózových hydrogelů s přídavkem či bez přídavku lignohumátu byly použity jednoduché oscilační testy (frekvenční a deformační test). Jako měřící geometrie byla použita soustava deska-deska. Senzor měl průměr 40 mm a byl vyroben z titanu. Oscilační testy byly realizovány na přístroji Rheometer AR-G2 od společnosti TA

Instruments, Inc. (Příloha 2). U frekvenčního testu je měněna frekvence oscilací, zatímco amplituda deformace je udržována na konstantní hodnotě. V případě deformačního testu je měněna amplituda deformace, zatímco frekvence oscilací je udržována na konstantní hodnotě.

Experimentální nastavení frekvenčního testu bylo následující: rozsah frekvencí oscilací 20 – 0,01 Hz, při konstantní amplitudě deformace 0,1 % (vhodná amplituda deformace byla vybrána na základě předešlých deformačních testů, experimentálně bylo ověřeno, že 0,1 % amplituda deformace leží v lineární viskoelastické oblasti pro 1 hm. % agarózový gel).

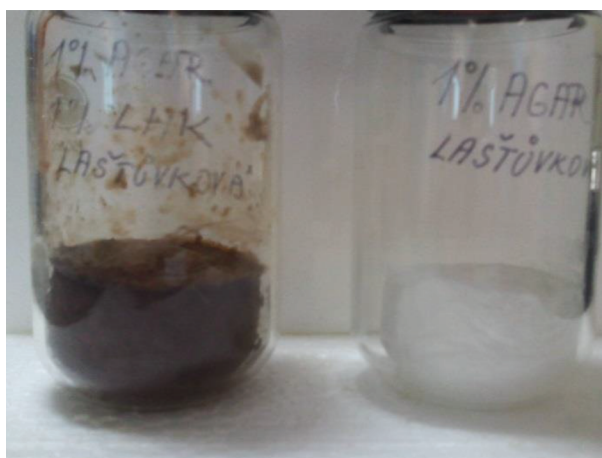
Parametry pro druhý z testů (deformační test) byly následující: amplituda deformace byla měněna v rozsahu 0,01 % až 200 %, při konstantní frekvenci oscilací 1 Hz. Všechny experimenty byly realizovány při teplotě 25 °C, která byla udržována na konstantní hodnotě pomocí průtokového termostatu typu Haake DC5.

Měřicí procedura byla realizována následovně: vzorek byl nadávkován na stacionární desku a následně byl stlačen do požadované tloušťky (1000 mikrometrů). Maximální normálová síla, která byla vyvinuta na vzorek během stlačování, byla 5 N. Po stlačení do měřicí polohy byl vzorek podroben 5 minutové relaxaci při teplotě měření (25 °C). Následně jako první byl realizován frekvenční test. Po ukončení frekvenčního testu vzorek opět relaxoval po dobu 5 minut při teplotě 25 °C, a poté byl proveden test deformační.

Stereomikroskopie hydrogelových materiálů

Další metoda, která byla využita pro studium vlastností hydrogelových systémů byla stereomikroskopie. Tento druh světelné mikroskopie umožňuje pozorování vzorku s různým zvětšením v třidimenzionálním rozměru. Na rozdíl od klasické optické mikroskopie využívá stereomikroskop menšího zvětšení a větší pracovní vzdálenosti. Výsledkem je nejen 3D obraz studovaného exponátu, ale navíc umožňuje vnímat hloubky a kontrasty struktur vzorku.

Připravené agarózové hydrogely (čistý a s příměsí lignohumátu) byly zmrazeny a voda byla odstraněna lyofilizací, čímž byly získány gely v suché podobě tzv. xerogely (Obr. 25). Takto vzniklé materiály měly charakter tuhé porézní pěny, předpokládáme však, že vnitřní struktura pevné sítě se v tomto stavu neliší od struktury disperzního podílu hydrogelu. Jejich studie byla provedena na stereomikroskopu, čímž byl získán 3D obraz jejich povrchu. Díky pořízeným snímkům byl získán nový pohled na povrch těchto materiálů.



Obr. 25: Lyofilizované vzorky agarózových hydrogelů – 1 hm. % agaróza s příměsí 1 hm. % LH (vlevo), 1 hm. % agaróza (vpravo).

Rtuťová porozimetrie hydrogelových materiálů

Rtuťová porozimetrie (MIP) je metoda založena na principu vtačování rtuti pod tlakem do pórů materiálu, dutin a stanovení tak distribuce pórů. Touto metodou stanovujeme nejen velikosti pórů, ale také totální objem pórů, zdánlivou hustotu nebo třeba specifický povrch plochy vzorku. Pomocí rtuťové porozimetrie můžeme zjišťovat informace o formaci, struktuře a potenciálu celé řady látek.

Jedním z omezení rtuťové porozimetrie je skutečnost, že rtuť je schopna se dostat pouze k vnějším pórům, ale nikoli k vnitřním. Avšak díky různým softwarovým technologiím, může být interpretace porézních sítí umožněna. Rtuťová porozimetrie navíc umožňuje zkoumat materiály s póry v rozmezí 500 μm až 3,5 nm. Tlak potřebný k vyvolání intruze rtuti do pórů ve vzorku je přitom nepřímo úměrný velikosti pórů.

Studie hydrogelů byly prováděny na rtuťovém porozimetru (MIP) typu Poromaster 60. Agaróзовые materiály byly v první řadě lyofilizovány a poté použity pro následující měření. Navážka čistého agaróзовého hydrogelu odpovídala 0,009 7 g. Nastavení přístroje pro toto měření bylo následující: rozmezí tlaků bylo nastaveno od 0,2 – 50 PSI. Obdobně byl nastaven přístroj i pro druhý typ vzorku, přičemž pro zkoumání pórů bylo odváženo 0,013 3 g. Výstupem z tohoto měření byly distribuční křivky znázorňující distribuci velikosti pórů (Kapitola 6.2.2) přítomných v lyofilizovaných vzorcích hydrogelu.

Skenovací elektronová mikroskopie hydrogelových materiálů

V neposlední řadě byl pro studium hydrogelových systémů využit skenovací elektronový mikroskop. SEM je přístroj určený k pozorování povrchů nejrůznějších objektů. Tento druh mikroskopu je analogií světelného mikroskopu v dopadajícím světle, avšak interakce elektronů s preparátem je poněkud odlišná. Skenovací elektronová mikroskopie patří mezi nepřímé metody. Velkou předností tohoto typu mikroskopu je jeho velká hloubka ostrosti, díky níž lze v dvojrozměrných fotografiích nalézt trojrozměrný aspekt.

Tento druh mikroskopu je založen na vyražení sekundárních elektronů z vnější elektronové slupky atomů preparátu, přičemž při dopadu elektronů na povrchu vzorku může dojít k uvolnění elektronu. Ten vyvolá přechod některých elektronů z vyšších energetických hladin do vakance, což způsobí uvolnění velkého kvanta energie, tedy dojde k emisi.

Pro tento typ charakterizace bylo opět využito lyofilizovaných vzorků hydrogelů, přičemž byl použit SEM typu ZEISS EVO LS 10. Lyofilizované vzorky hydrogelů byly podrobeny měření od 23 – 6 000 násobného zvětšení. Vstupní proud byl nastaven na hodnotu 10 kV. Výsledkem z měření byly snímky 3D struktur hydrogelů s přídavkem a bez přídavku lignohumátu.

5.6 Difúzní experimenty

5.6.1 Příprava agaróзовých gelů

Pro studium transportních procesů huminových látek bylo využito agaróзовých hydrogelů, coby vhodných materiálů z hlediska jejich unikátních vlastností, o kterých jsme se již zmínili výše (Kapitola 3.3.2). Agaróza je biopolymer, z něhož je možné připravit termoreverzibilní hydrogely, které navíc disponují neionogenním charakterem, jsou tedy chemicky inertní. Díky této výhodě a dalším pozitivním vlastnostem gelových systémů, byl tento typ hydrogelu

zvolen jako nosná polotuhá matrice umožňující jednoduché vizuální pozorování transportu lignohumátu skrz studované kutikuly.

Pro naše experimenty byly připraveny dva druhy hydrogelů. Pro první typ byl zvolen hydrogel s obsahem 1 hm. % agarózy (AG), připravený tím způsobem, že do 10 cm³ destilované vody bylo přidáno 0,1 g agarózy. Tento roztok byl zahříván za stálého míchání na teplotu 85 °C, přičemž došlo k úplnému rozpuštění pevného podílu v solu. V případě, že roztok obsahoval velké množství bublin, které by mohly způsobovat problémy při následujících difúzních experimentech, byly odstraněny za užití ultrazvukové lázně vytemperované na 85 °C, ve které byl roztok ponechán 1 minutu. Takto připravený roztok byl nalit do plastové kyvety (PMMA) a byl ponechán ke zchladnutí po dobu 45 minut. Tímto způsobem byl připraven čirý hydrogel, který je v následujícím textu označován jako *přijímací hydrogel* (PH) (Obr. 26).



Obr. 26: Příprava přijímacích hydrogelů (1 hm. % agaróza).

Druhý typ hydrogelu byl připravován obdobným způsobem, jen s tím rozdílem, že nejprve byl připraven zásobní roztok 1 hm. % lignohumátu, ze kterého bylo odpipetováno 10 cm³ roztoku, k němuž byl přidán 0,1 g agarózy (AG + LH). Opět byl tento roztok umístěn na vařič, kde byl za stálého míchání přiveden k teplotě 85 °C, vzniklé bubliny byly odstraněny v ultrazvukové lázni opět vytemperované na teplotu 85 °C a následně byl roztok vlit do plastových kyvet. Poté byl roztok ponechán ke ztuhnutí po dobu 45 minut. Výsledkem byl vznik tmavě-hnědého polotuhého materiálu, který bude dále označován jako *zdrojový hydrogel* (ZH) (Obr. 27).



Obr. 27: Příprava zdrojových hydrogelů (1 hm. % agaróza a 1 hm. % lignohumát).

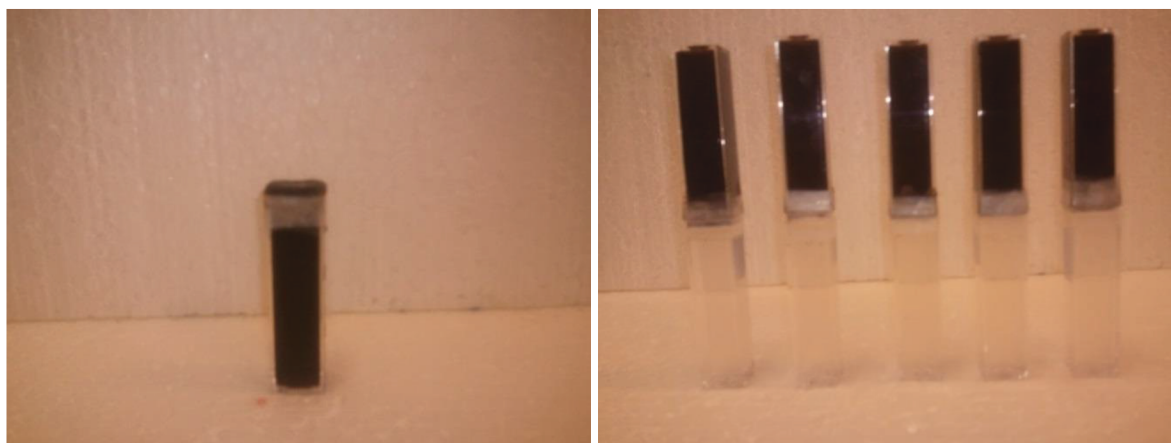
5.6.2 Experimentální studium volné difúze skrz kutikulu

Transportní procesy v difúzním páru

V této kapitole se již budeme věnovat přípravě difúzních modelů, jejichž prostřednictvím jsme byli schopni studovat transportní procesy lignohumátu přes rostlinné kutikuly. Tato kapitola navazuje na Kapitulu 5.3, ve které byl popsán proces separace listových bariér a zároveň na Kapitulu 5.6.1, která je zaměřena na přípravu hydrogelových médií, coby transportních materiálů.

Difúzní experimenty probíhaly metodou tzv. *difúzního páru*, připraveného kombinací agarózových gelů bez příměsí respektive s příměsí studovaného materiálu, mezi něž byla upevněna rostlinná kutikula, coby bariérový materiál ovlivňující penetraci látek. Po ztuhnutí přijímacího (1 hm. % agaróza) a zdrojového (1 hm. % agaróza a 1 hm. % LH) hydrogelu, byla kutikula připevněna parafilmem na ZH (Obr. 28 – vlevo). Přitom bylo s touto kutikulou zacházeno velmi opatrně, aby nedošlo k jejímu poškození (protržení). Poté byl k tomuto gelu připevněn PH opět pomocí parafilmové fólie, čímž byly izolovány možné netěsnosti systému (Obr. 28 – vpravo). Zároveň tento těsnící materiál pomohl eliminovat možné odpaření vody z hydrogelů a dehydrataci kutikul, čímž by tyto nežádoucí vlivy mohly ovlivnit difúzní procesy.

Takto připravené vzorky difúzních párů byly každý den proměřovány po dobu 10 až 14 dnů na UV-VIS spektrofotometru typu Varian Cary 50 (Příloha 3). Pro toto měření bylo vždy nutné rozpojit difúzní pár a změřit absorpční spektra (v rozsahu 300 – 900 nm) přijímacího hydrogelu v různé vzdálenosti od kutikuly. Proměrování PH s nadifundovaným LH po jednotlivých milimetrech od rozhraní (kutikula/gel) byl umožněn za pomoci posuvného nástavce vlastní konstrukce a výroby (Příloha 4).



Obr. 28: Uchycení kutikuly parafilmem na ZH (1 hm. % agaróza a 1 hm. % LH) (vlevo), příprava difúzních párů (vpravo).

Transportní procesy ze zdrojového roztoku

Tento typ experimentů byl připraven analogicky, jako je tomu v předchozím experimentu. Nejprve byl připraven 1 hm. % roztok lignohumátu, který byl důkladně rozmíchán na magnetické míchačce. Poté byly připraveny květy s čistým 1 hm. % agarózovým hydrogelem, dle postupu, který nám je již znám (Kapitola 5.6.1). Po ztuhnutí těchto materiálů k nim byla parafilmem připevněna rostlinná kutikula.

Experiment spočíval v tom, že do jedné nádoby s roztokem lignohumátu byl vložen jeden vzorek od každého druhu izolované kutikuly připevněné na přijímacím hydrogelu, tedy od chemicky izolovaných kutikul vždy jedna svrchní a jedna spodní a stejně tak tomu bylo v případě enzymaticky izolovaných kutikul. Tento experiment byl duplikován z důvodu statistického vyhodnocení. Celkem byly tyto experimenty prováděny po dobu 3 dnů, přičemž zdrojové roztoky lignohumátu byly míchány na vícemístné magnetické míchačce (250 ot./min.). Dále tyto experimenty posloužily ke studiu jednotlivých druhů rostlinných kutikul, které jsou popsány v Kapitole 5.5.1.

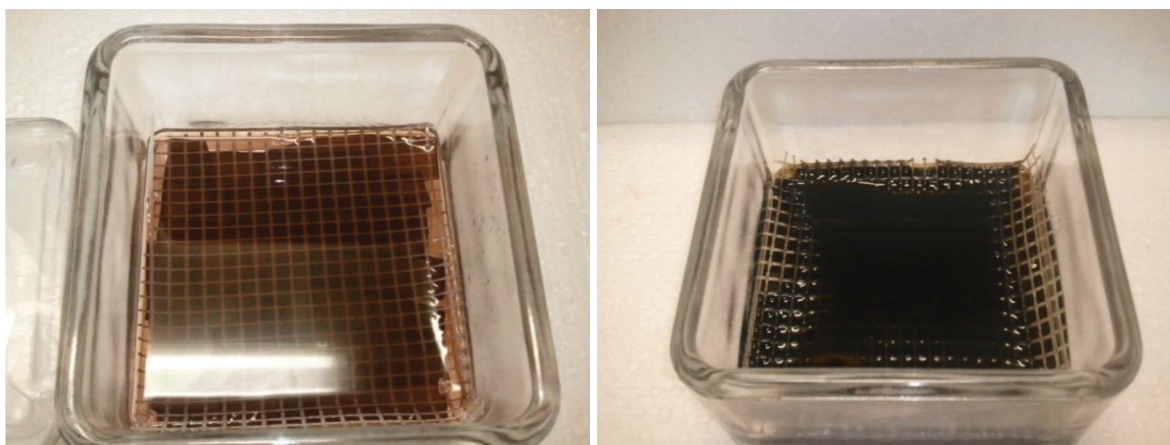
6 DISKUZE A VÝSLEDKY

6.1 Separace rostlinných kutikul

Rostlinné kutikuly byly izolovány dvěma metodami, a to metodou enzymatickou a chemickou. Jedná se principiálně o dva odlišné procesy, jak již vyplývá z názvů, enzymatická izolace je založena na působení přírodního enzymu pektinázy resp. celulózy za mírných podmínek. Enzymy jsou zodpovědné za degradaci rostlinných pletiv za vzniku čistých světle hnědých kutikul.

Chemická metoda izolace taktéž vede ke vzniku světlých kutikul, avšak tato metoda je výrazně drastičtější. Látky, které se separace kutikul účastní, jsou silně kyselé anorganické sloučeniny, konkrétně chlorid zinečnatý a kyselina chlorovodíková.

Z fotografií (Obr. 29) je patrný rozdíl mezi těmito metodami. Roztok u enzymatické metody izolace je po 6 týdnech působení světle hnědý, kdežto v případě chemické metody dochází ke vzniku černého roztoku, což je způsobeno rozpadem mezofylu.



Obr. 29: Nádoby pro enzymatickou (vlevo) a chemickou (vpravo) metodu izolace před separací rostlinných kutikul.

V obou případech separace bylo třeba dbát zvýšené opatrnosti, aby nedošlo k poškození kutikul, při základním vizuálním posouzení mají kutikuly izolované oběma metodami velmi podobné vlastnosti. Oba typy kutikul jsou světle hnědé a čiré (Obr. 23 a Obr. 24 – vpravo), avšak při odstraňování rostlinných pletiv se lépe manipulovalo s listy, které byly izolovány chemicky než enzymaticky. Avšak z hlediska pevnosti a tedy i manipulace se kutikuly izolované CHMI a EMI z listu *Prunus laurocerasus* chovaly stejně, s oběma se snadno pracovalo a manipulovalo.

6.2 Charakterizace použitých materiálů

6.2.1 Charakterizace rostlinných kutikul

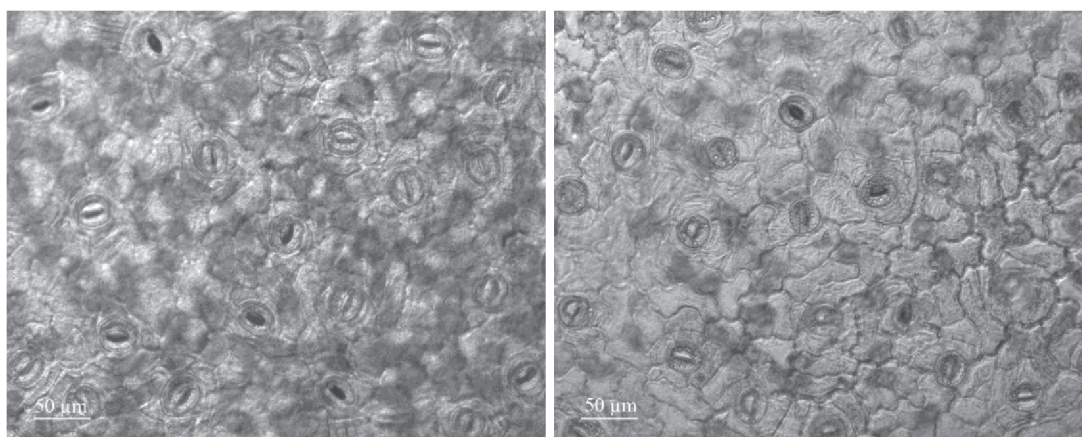
Studium rostlinných kutikul optickou mikroskopií

Po separaci rostlinných kutikul CHMI a EMI byla provedena jejich strukturní charakterizace pod optickým a následně fluorescenčním mikroskopem. V první řadě je velmi důležité rostlinné kutikuly rozdělit dle abaxiální a adaxiální strany. Toto rozlišení je následně zohled-

něno při difúzních experimentech, protože je očekávána jiná rychlost průchodu aktivních látek (v našem případě lignohumátu draselného) skrz abaxiální respektive adaxiální kutikulu.

Prvotní rozlišení kutikul bylo provedeno na optickém mikroskopu Nikon Eclips Ci, díky němuž bylo možné nejen pořídit snímky svrchní a spodní strany kutikul, ale také provést charakterizaci stomat přítomných právě na spodních kutikulách. Ty jsou totiž primárně zodpovědné za regulaci transportu vody, kyslíku, nutričních látek apod. v listech (Kapitola 3.2.3).

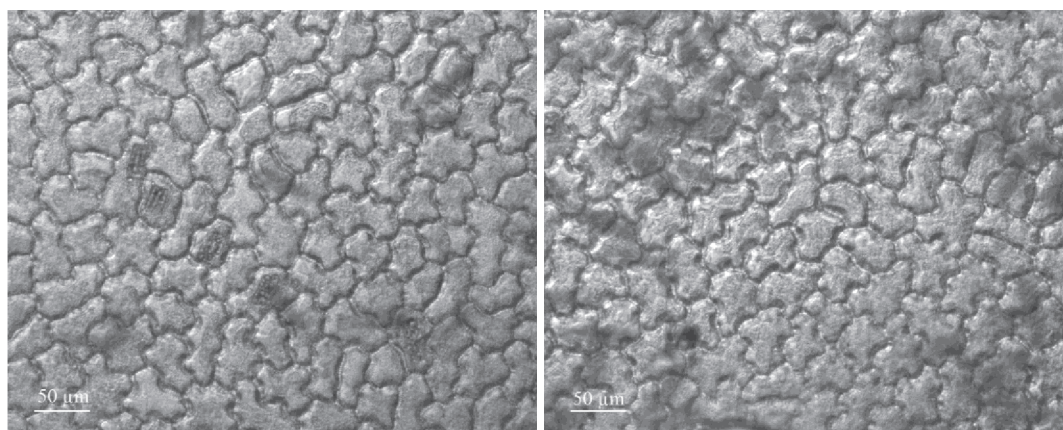
Na prvním snímku (Obr. 30) jsou znázorněny vybrané vzorky enzymaticky izolovaných kutikul, kde zřetelně můžeme vidět strukturu abaxiální kutikuly nacházející se na spodní straně listu.



Obr. 30: Snímky enzymaticky izolovaných abaxiálních kutikul, vzorek 4 (vlevo) a vzorek 5 (vpravo).

Z výše uvedených fotografií je zřejmé, že při porovnání jednotlivých EIK se od sebe kutikuly nijak výrazně neodlišují. Jsou tvořeny pletivovou sítí a průduchy, které jsou nepravidelně uspořádány po celé zobrazené ploše. Některé jsou více či méně otevřené, ale jinak tyto kutikuly vypadají na první pohled stejně, a proto by se měly i stejně chovat z hlediska transportních mechanismů.

Za stejných podmínek byly zkoumány také svrchní strany listů, tedy adaxiální kutikuly, které byly izolovány obdobným způsobem, jako kutikuly na předešlých snímcích. Pro znázornění byly opět vybrány jen některé vzorky ze všech studovaných objektů, jak můžeme vidět Obr. 31.



Obr. 31: Snímky enzymaticky izolovaných adaxiálních kutikul, vzorek 4 (vlevo) a vzorek 5 (vpravo).

Na pořízených snímcích svrchních stran kutikul opět nejsou viditelné žádné markantní rozdíly, které by mohly mít za důsledek odlišnou difuzivitu látek. Pokud ovšem porovnáme

Obr. 31 a Obr. 30, všimneme si, že svrchní strana kutikul neobsahuje stomata, jako je tomu v případě spodních kutikul. Proto se dá předpokládat odlišné bariérové chování adaxiální a abaxiální kutikuly. O této problematice blíže pojednává Kapitola 6.3.1.

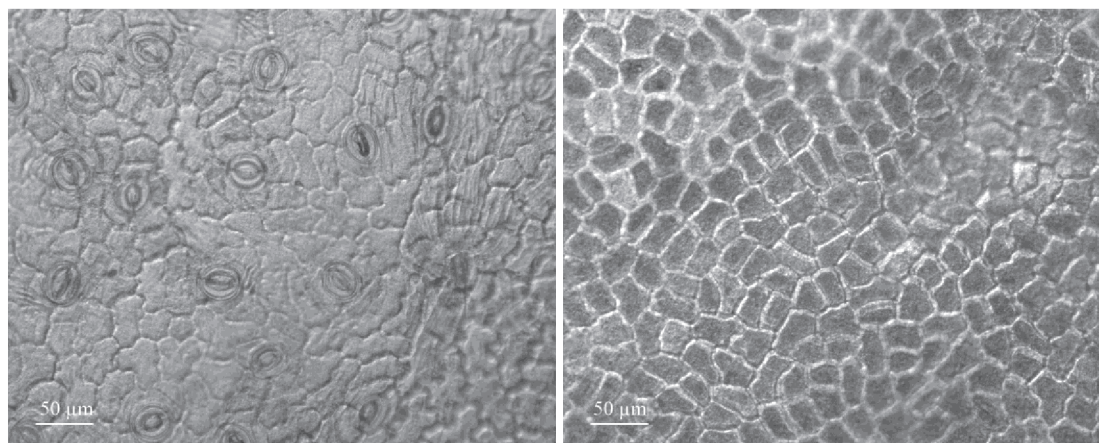
Pomocí softwaru uEyeCockpit bylo možné nejen pořídit snímky kutikul na svrchní a spodní straně listu, ale také vyhodnotit průměrnou velikost přítomných průduchů. Tento fakt byl pro nás velmi důležitý, aby bylo možné vytvořit standartní vzorek, vůči kterému by byly studované difúzní experimenty přes kutikuly porovnány. O tom více pojednává kapitola 6.3.2. Hodnoty získané z měření průměrů stomat byly zapsány do Tab. 3.

Tab. 3: Hodnoty velikostí stomat.

vz. 1 (μm)	vz. 2 (μm)	vz. 3 (μm)	vz. 4 (μm)	vz. 5 (μm)	vz. 6 (μm)	vz. 7 (μm)
12,500	12,415	14,290	12,135	13,050	13,644	14,905
12,425	15,930	13,465	13,275	10,095	14,350	14,650
12,039	13,535	12,145	13,345	10,810	13,545	15,365
12,842	11,995	10,532	12,575	12,025	12,830	45,541
12,313	17,015	12,79	10,435	10,575	12,855	12,779
12,424	14,178	12,65	12,353	11,311	13,445	14,648

Velikost stomat byla zprůměrována a výsledná hodnota odpovídala $(13,000 \pm 1,157)$ μm.

Obdobné studie byly provedeny také na kutikulách, které byly izolovány chemickou metodou. Na základě tohoto pozorování jsme chtěli zjistit, jestli se struktury těchto tenkých bariér nějak od sebe neodlišují. Mikroskopická analýza chemicky izolovaných kutikul (abaxiální a adaxiální strana) Obr. 32.



Obr. 32: Snímky struktury chemicky izolovaných kutikul, spodní (vlevo), svrchní (vpravo).

Rozdíl mezi chemicky a enzymaticky izolovanými kutikulami není ze snímku nijak zřejmý. Enzymatické kutikuly mají kolem sebe tmavší prostředí (skvrny), což u chemicky izolovaných kutikul nepozorujeme. Tato tmavá místa mohou být způsobena nedokonalým odstraněním mezofylu. S výjimkou těchto skvrn, nejsou žádné další rozdíly mezi kutikulami pozorovány. Hodnoty získané z měření velikostí stomat jsou zapsány v Tab. 4.

Tab. 4: Velikosti průměrů stomat.

vz. 1 (μm)	vz. 2 (μm)	vz. 3 (μm)	vz. 4 (μm)	vz. 5 (μm)	vz. 6 (μm)	vz. 7 (μm)
15,025	13,910	13,223	13,240	8,970	16,820	15,151
16,142	11,761	10,920	16,675	12,773	16,510	15,337
18,438	12,619	15,156	11,699	10,164	17,202	14,455
12,625	14,950	16,429	15,393	12,110	14,295	17,311
12,938	14,348	13,231	13,133	9,025	15,432	16,842
15,034	13,518	13,792	14,029	10,608	16,052	15,819

Velikosti pórů byly zprůměrovány a výsledkem byla hodnota $(14,122 \pm 1,838)$ μm.

Ze stanovených průměrů stomat můžeme tvrdit, že při chemické či enzymatické izolaci kutikul nedochází k ovlivnění velikostí stomat přítomných na abaxiální straně. Na základě optické mikroskopie a pořízených snímků můžeme dále tvrdit, že ať probíhá izolace kutikul CHMI nebo EMI, nemají tyto roztoky vliv na změnu či poškození kutikul.

Při zkoumání rostlinných kutikul pod optickým mikroskopem typu Olympus IX71 s fluorescenčním modulem, který umožňuje zobrazení emise záření studovaným materiálem, bylo zjištěno, že tento druh přírodních bariér je schopný tzv. *samovolné fluorescence*. Na enzymaticky izolované kutikuly bylo posvíceno speciální lampou přes filtry o různých vlnových délkách a bylo zjištěno, že při vlnové délce 365 nm tyto přírodní bariéry emitují růžové světlo, při 405 nm červenooranžové, při 470 nm žluté a při 530 a 552 nm emitují červené světlo.

Stejným způsobem byly studovány chemicky izolované kutikuly, které se taktéž vyznačovaly svojí schopností samovolné fluorescence, avšak s tím rozdílem, že jejich emise probíhala za jiného barevného vyzáření. Při ozáření lampou pod filtrem 365 nm emitovala kutikula modré světlo, při 405 nm žlutozelené, při 470 nm zelené a při 530 a 552 nm červené světlo.

Tento typ instrumentace bohužel neumožňuje barevně rozlišený záznam pozorovaného materiálu, proto pro přehlednější znázornění tohoto měření byly výsledky sepsány do Tab. 5.

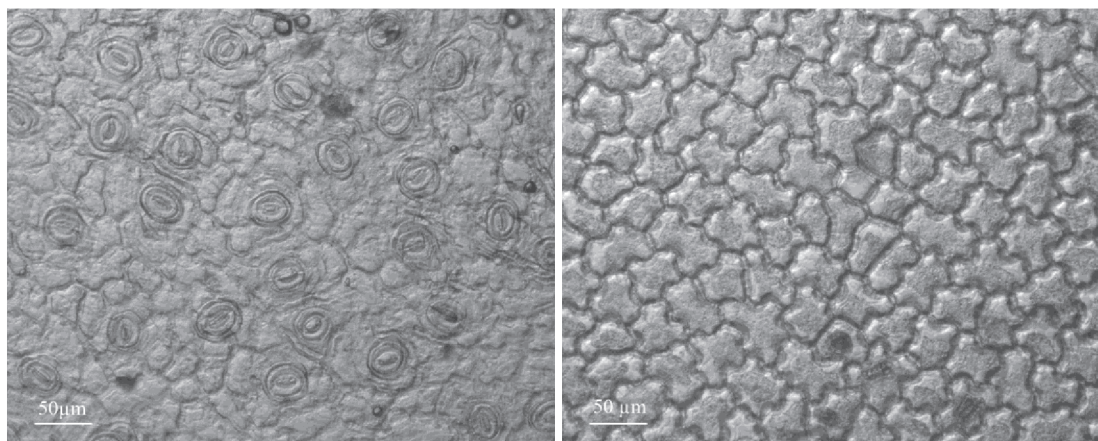
Tab. 5: Přehled samovolné fluorescence rostlinných kutikul.

Filtry (nm)	enzymatická kutikula	chemická kutikula
365	růžové světlo	modré světlo
405	červenooranžové světlo	žlutozelené světlo
470	žluté světlo	zelené světlo
530	červené světlo	červené světlo
552	červené světlo	červené světlo

Zdali tato zjištěná fakta mají nějaký výraznější vliv na transport látek či strukturu na samotné kutikuly, nebylo prozatím potvrzeno ani vyvráceno. Jednou z možných metod, které by mohly více objasnit tento nový poznatek, je fluorescenční mikroskopie (Kapitola 6.2.1).

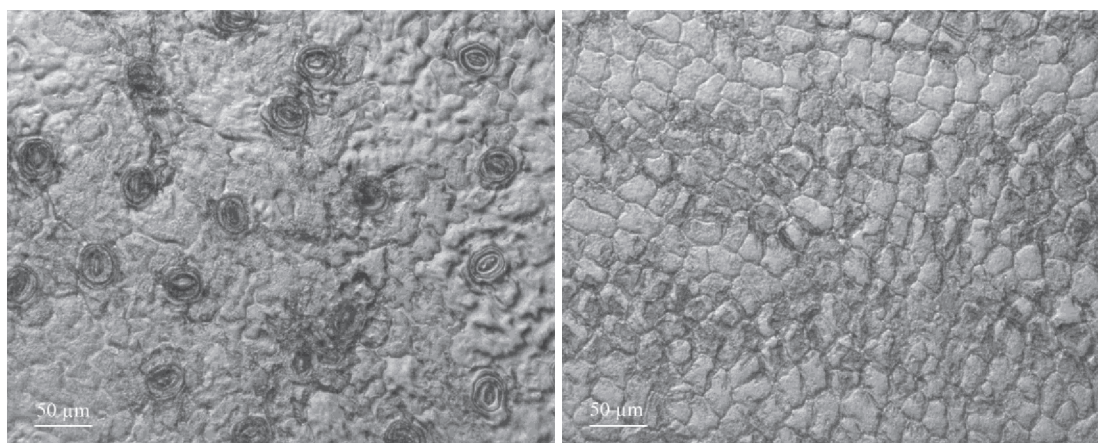
Na optickém mikroskopu byly dále studovány degradace kutikul. Nejprve byly kutikuly izolovány z listů a struktura byla proměřena na mikroskopu, aby byly v případě poškození vyraženy. Dále byly tyto přírodní struktury sledovány v časech 0, 5 a 10 dnů od doby izolace, aby bylo zjištěno, zdali u nich nedochází k nějakým strukturním změnám, které by měly za

následek ovlivnění difúzních procesů. Snímky kutikul po 5. a 10. dnu od separace jsou znázorněny na Obr. 33 a Obr. 34.



Obr. 33: Enzymaticky izolované kutikuly – spodní (vlevo), svrchní (vpravo) – degradace 5. den.

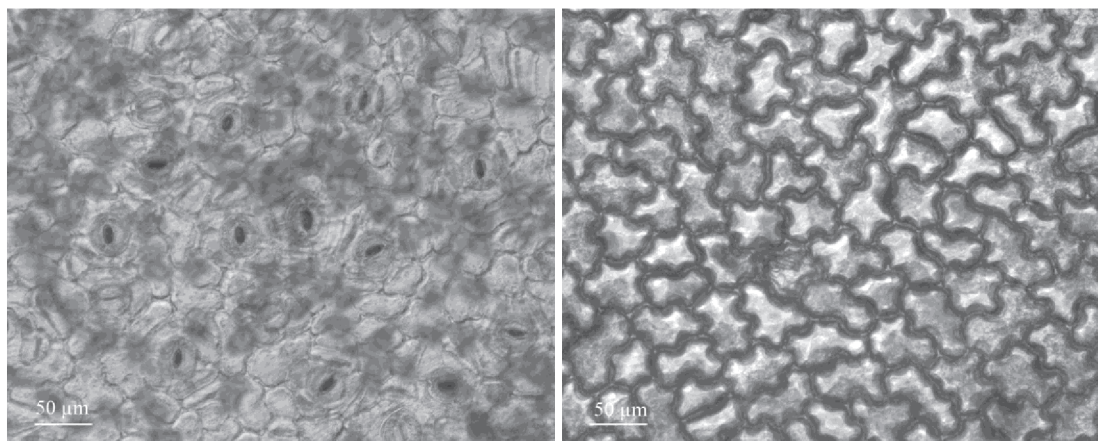
Na snímcích (Obr. 33) nejsou viditelné žádné změny z hlediska stavby nebo struktury kutikul, proto můžeme tvrdit, že u EIK nedochází po 5 dnech od izolace k žádným změnám, a proto by se kutikuly měly chovat stejně, jako tomu je v den izolace (Obr. 30 a Obr. 31).



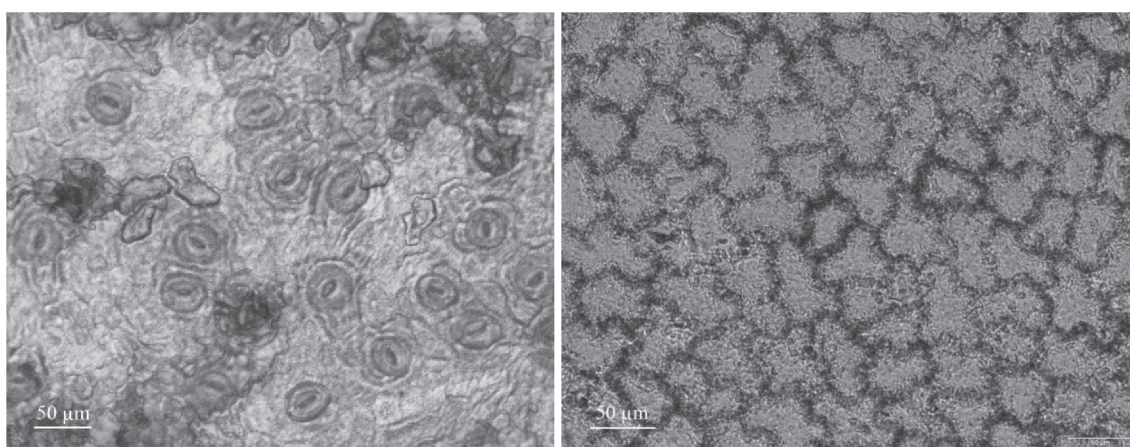
Obr. 34: Chemicky izolované kutikuly – spodní (vlevo), svrchní (vpravo) – degradace 5. den.

V případě chemicky izolovaných kutikul taktéž nepozorujeme žádné výrazné změny z hlediska jejich degradace. Tudíž můžeme opět tvrdit, že po 5 dnech od separace kutikul nedochází k ovlivnění difúzních procesů huminových látek vlivem stárnutí kutikul.

Poslední měření bylo provedeno po 10 dnech od izolace kutikul (Obr. 35 a Obr. 36). Enzymaticky izolované kutikuly opět nevykazovaly žádné změny ve struktuře, které by měly za následek ovlivnění bariérových vlastností. U chemicky izolovaných kutikul, ale toto s jistotou tvrdit nemůžeme, protože v jejich struktuře začalo docházet k degradaci stomat a rostlinných pletiv přítomných v těchto kutikulách, proto lze tvrdit, že již může docházet k ovlivnění difúzních procesů vlivem stárnutí kutikul. Dokonce bylo mikroskopicky ověřeno, že s časem dochází u kutikul získaných chemickou metodou k „rozkapénkování“ přítomných stomat a rostlinných pletiv, což u enzymaticky izolovaných kutikul se začalo projevovat až po velmi dlouhé době cca. 3 – 4 týdny.

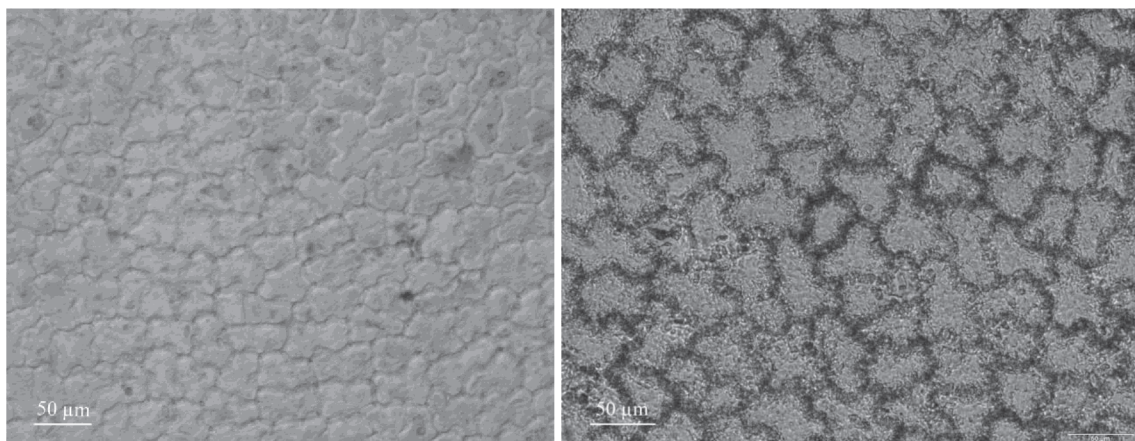


Obr. 35: Enzymaticky izolované kutikuly – spodní (vpravo) a svrchní (vlevo) – degradace 10. den.



Obr. 36: Chemicky izolované kutikuly – spodní (vpravo), svrchní (vlevo) – degradace 10. den.

Při těchto studiích byla pozorována další zajímavost, a to degradace kutikul ve vodném prostředí respektive na vzduchu. Na základě vypracované literární rešerše (Kapitola 4.1) jsme se domnívali, že dehydratace kutikulám nesvědčí a způsobuje jejich degradaci. Zároveň jsme si také mysleli, že vysušené rostlinné kutikuly ovlivňují transport látek, ale z mikroskopických studií se ukázalo, že v suchém prostředí zůstávají struktury v kutikule déle viditelné, tedy pomaleji degradují, než v případě kutikul, které byly uchovávány ve vodném roztoku. Pro názornou ukázkou byl uveden Obr. 37, mikrofotografie ostatních vzorků jsou uvedeny v Příloze 5.



Obr. 37: Chemicky izolované kutikuly – svrchní ve vodném prostředí (vlevo) a svrchní v suchém prostředí (vpravo) – 10. den degradace.

Dále byly pod optickým mikroskopem studovány kutikuly, které byly vystaveny působení roztoku lignohumátu. Vzhledem k tomu, že roztok LH (1 hm. %) byl dosti koncentrovaný, nebyly získané snímky kvalitní pro publikování, navíc se lignohumát na snímcích podílel na vzniku tmavých skvrn, proto nebyly tyto snímky dále zpracovávány a jako věrohodnější byly brány v úvahu snímky z fluorescenčního mikroskopu.

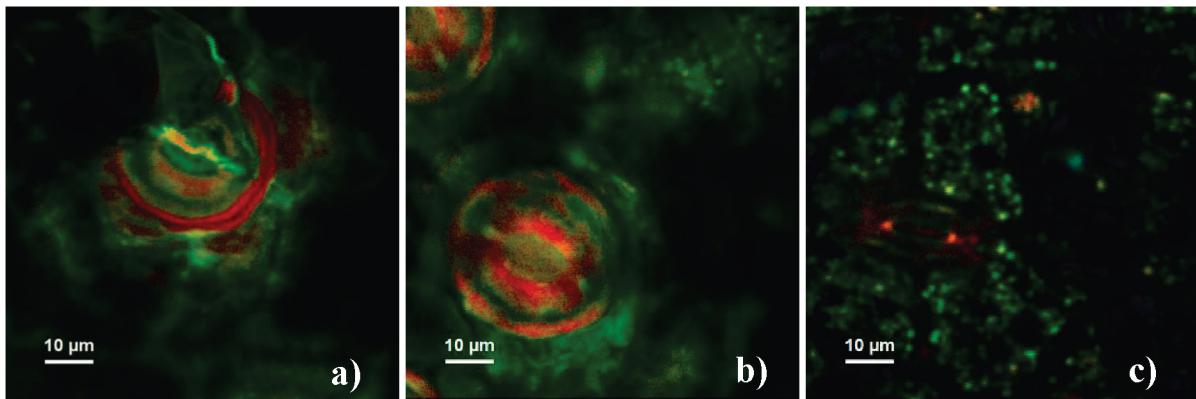
Studium rostlinných kutikul fluorescenční mikroskopii

Izolované rostlinné kutikuly byly dále podrobeny fluorescenční mikroskopii, která nám umožnila studovat tyto materiály z hlediska dob života fluorescence přítomných skupin v těchto strukturách a tím podrobněji charakterizovat jejich fyzikálně-chemický stav. Zároveň by nám tato metoda mohla více objasnit rozdíly mezi EIK a CHIK, které v předcházejících kapitolách nevykazovali signifikantní rozdíly ve struktuře.

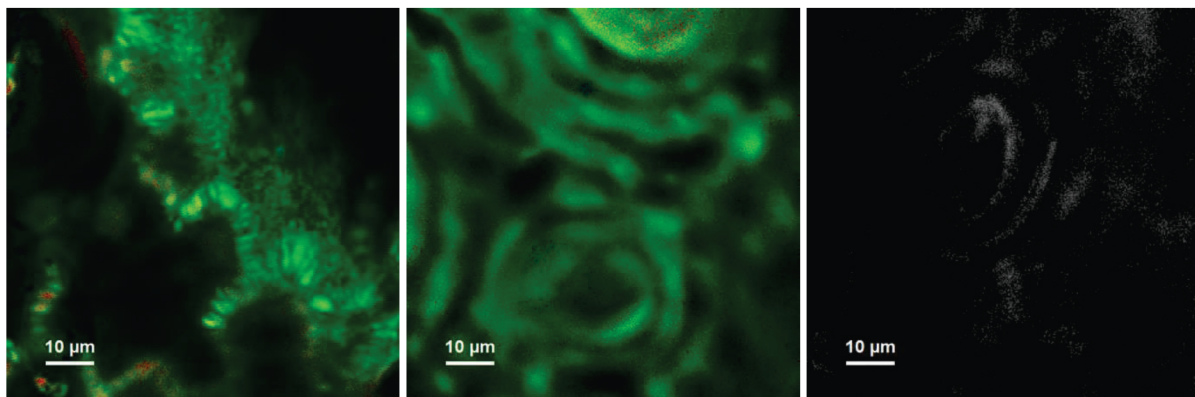
Celé toto měření bylo prováděno za použití fluorescenčního mikroskopu MicroTime 200 (Příloha 1). Výstupem z měření byly snímky, na nichž jsou různými odstíny barev odlišena místa s rozdílnou dobou fluorescence a dále distribuční křivky dob života fluorescence. Připomeňme, že doba života vyjadřuje dobu, po jakou jsou funkční skupiny obsažené v kutikule v excitovaném stavu.

V první řadě byla pro základní posouzení použitelnosti metody provedena pilotní měření zkušebních vzorků, jehož výsledky jsou uvedeny v Příloze 7. Na základě tohoto měření byly navrženy experimenty zaměřené na posouzení vlivu působení 1 hm. % roztoku lignohumátu na studované kutikuly a to v čase 1, 2 a 3 dny. Poté byly pořízeny snímky kutikul a vyhodnoceny distribuční křivky, které znázorňovaly doby života látek obsažených v kutikule, čímž bylo možné pozorovat, jak dochází k postupnému pohasínání (přirozené fluorescence kutikul). Toto zhášení ilustruje pozvolnou degradaci kutikuly. Nakonec byly obdobným způsobem studovány rostlinné kutikuly, které nebyly působení LH vystaveny, tato měření byla prováděna v čase 3, 4, 5 a 11 dní po izolaci.

Nyní se budeme věnovat popisu dějů týkajících se difúzních experimentů, u nichž byly kutikuly vystaveny působení roztoku LH. Fotografické snímky pořízené z tohoto měření jsou znázorněny na Obr. 38 a Obr. 39. Tyto obrázky zachycují doby života funkčních skupin pro spodní strany kutikul izolovaných chemickou a enzymatickou metodou. Snímky z měření pro svrchní stranu kutikul EMI a CHMI jsou uvedeny v Příloze 8 a 9.



Obr. 38: Snímky z fluorescenčního mikroskopu abaxiálních stran enzymaticky izolovaných kutikul, doba působení LH: a) 1 den, b) 2 dny a c) 3 dny.

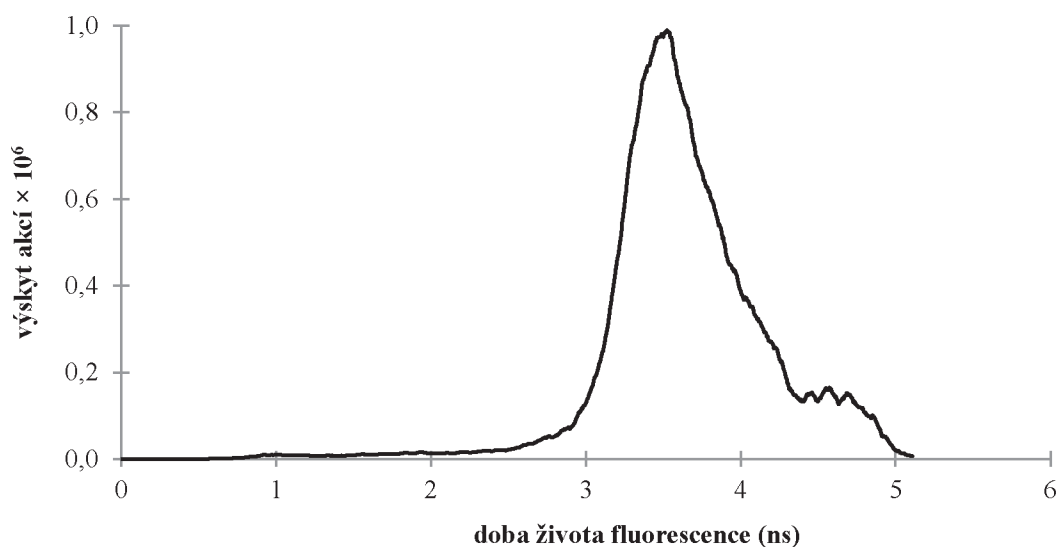


Obr. 39: Snímky z fluorescenčního mikroskopu abaxiálních stran chemicky izolovaných kutikul, doba působení LH: a) 1 den, b) 2 dny a c) 3 dny.

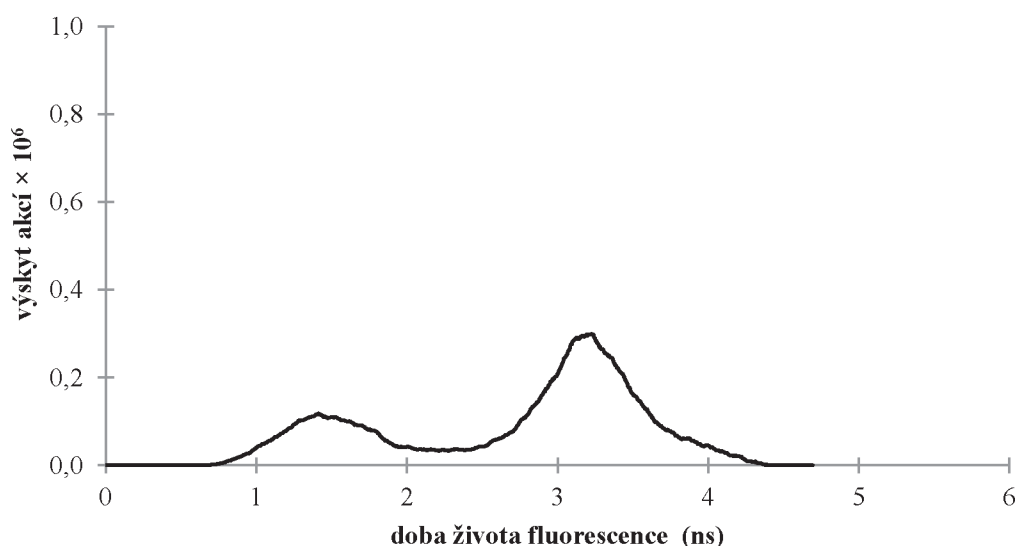
Z výše uvedených snímků je patrná změna v intenzitě zbarvení jednotlivých obrázků, které reprezentují zkracování dob života fluorescence, což je způsobeno postupnou degradací kutikul a také působením lignohumátu, který způsobuje pohasínání funkčních skupin v těchto přírodních útvarech. Nyní se ale zaměříme na objektivní stanovení dob života skupin v kutikule, které jsou znázorněny v grafech (Obr. 40 – Obr. 43).

Pro názornou ukázkou byly sestaveny grafy (Obr. 40 a Obr. 41), u nichž můžeme pozorovat posun dob života během působení 1 hm. % roztoku lignohumátu na kutikulu. Tyto křivky, které byly vyhlazeny pomocí programu *OriginPro 8*, zobrazují průběh distribuční křivky dob života fluorescence funkčních skupin, z čehož můžeme vyčíst, že u enzymaticky izolovaných kutikul je změna dob života fluorescence vlivem působení LH jen nepatrná. Po prvním dnu působení odpovídala doba života přítomných látek hodnotě 3,44 ns a v případě působení lignohumátu po dobu 3 dnů se jeho hodnota téměř nezměnila (přesněji dosahovala 3,13 ns).

Výsledky tohoto objektivního zhodnocení dob života fluorescence přítomných skupin v EIK můžeme shrnout v tvrzení, že roztok lignohumátu nemá žádný výraznější vliv na strukturu a degradaci funkčních skupin, které mohou být zodpovědné za efektivnější transport látek.



Obr. 40: Distribuční křivka dob života fluorescence skupin obsažených v enzymaticky izolované kutikule, doba působení LH – 1 den.

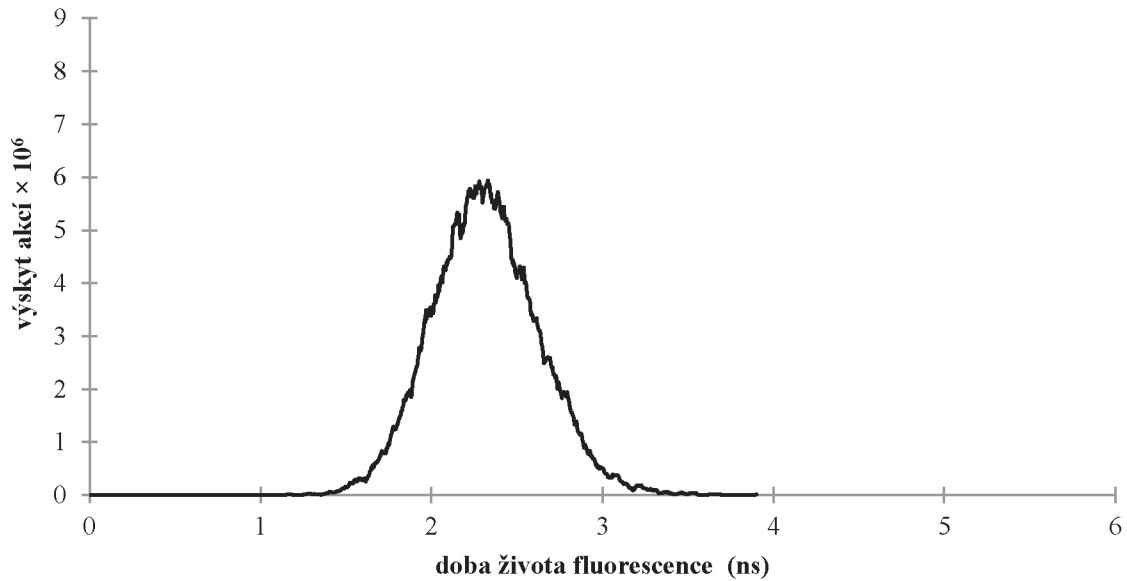


Obr. 41: Distribuční křivka dob života fluorescence skupin obsažených v enzymaticky izolované kutikule, doba působení LH – 3 dny.

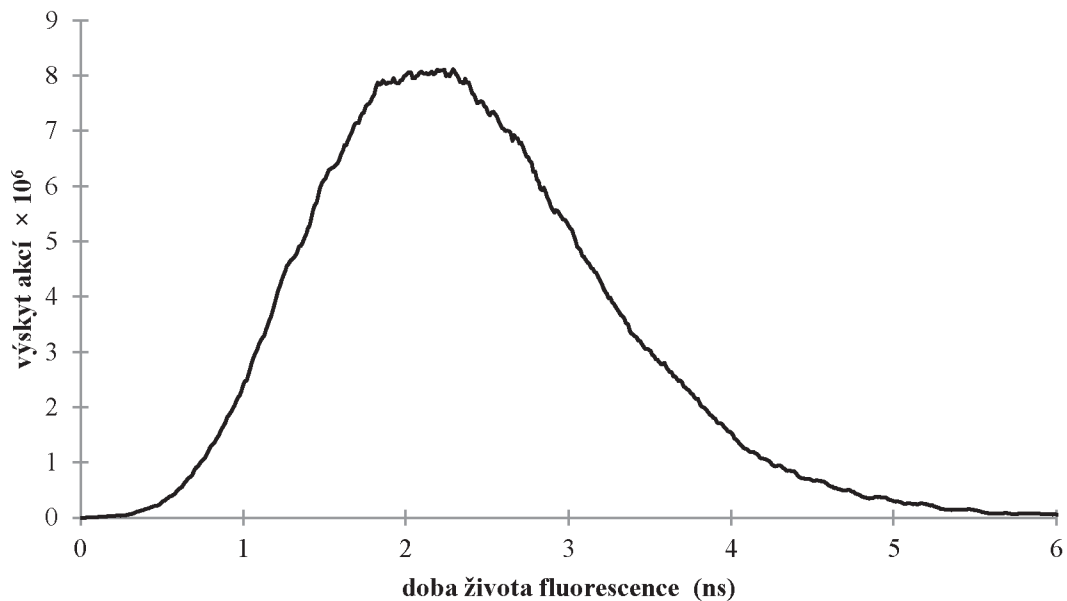
Obdobným způsobem byly studovány kutikuly, které byly izolovány chemickou metodou. Data získaná z měření byla opět vyhlazena v programu *OriginPro 8*, díky němuž byly získány distribuční křivky uvedené na Obr. 42 a Obr. 43. Pro názornou ukázkou byly vybrány dvě křivky, první distribuce zobrazuje průběh dob života fluorescence týkajících se skupin, které byly ponechány působení LH po dobu 1 dne a následně po ukončení difúzních experimentů, tedy po 3 dnech.

Hodnota doby života fluorescence skupin po prvním dnu působení lignohumátu byla stanovena na 2,24 ns, což je o poznání kratší doba, než bylo stanoveno u enzymaticky izolovaných kutikul, které byly ponechány působení roztoku LH po stejnou dobu. Po 3 dnech působení 1 hm. % roztoku LH byla stanovena doba života fluorescence látek na hodnotu 2,01 ns. Tento pokles (přibližně odpovídající poklesu doby života fluorescence enzymaticky

izolovaných kutikul) poukazuje na ještě vyšší stupeň degradace kutikuly, která může mít za následek omezení bariérových schopností chemicky izolovaných kutikul.

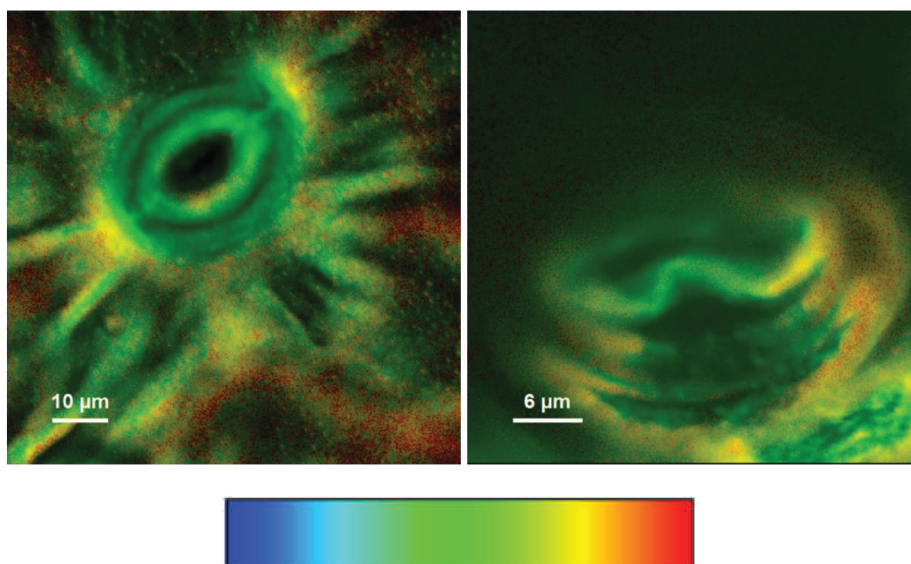


Obr. 42: Distribuční křivka dob života fluorescence skupin obsažených v chemicky izolované kutikule, doba působení LH – 1 den.

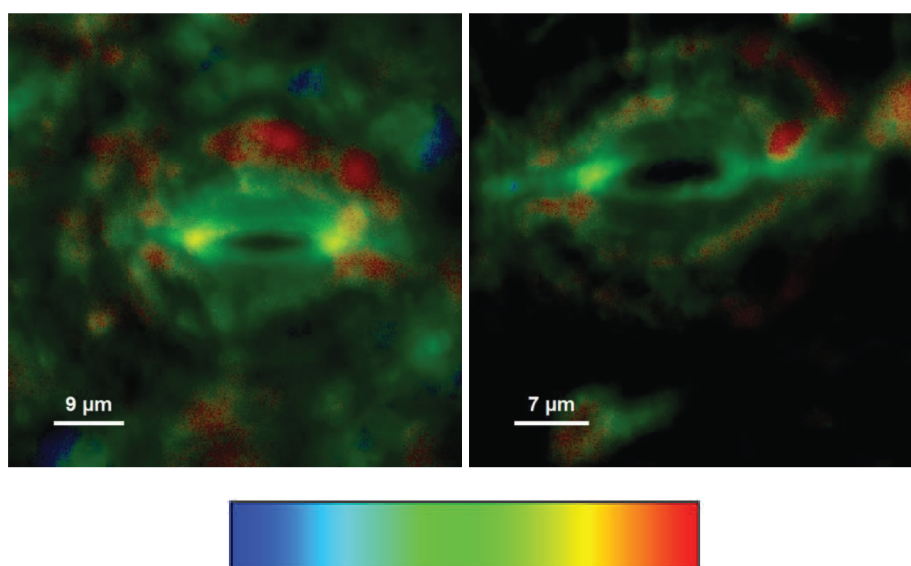


Obr. 43: Distribuční křivka dob života fluorescence skupin obsažených v chemicky izolované kutikule, doba působení LH – 3 dny.

Nyní se zaměříme na kutikuly, které nebyly vystaveny působení LH, ale pouze přirozené degradaci. Jako první budou uvedeny snímky kutikul těsně po izolaci (Obr. 44) a pro porovnání jsou zobrazeny snímky po 11 dnech od izolace (Obr. 45).

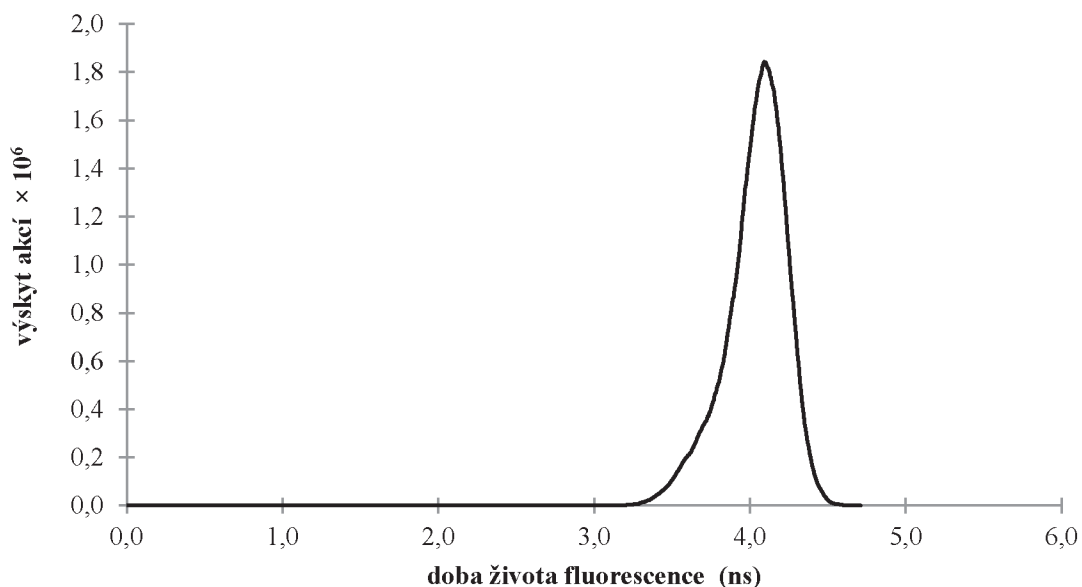


Obr. 44: Snímky z fluorescenčního mikroskopu abaxiálních stran kutikul těsně po izolaci, enzymatická (vlevo), chemická (vpravo).

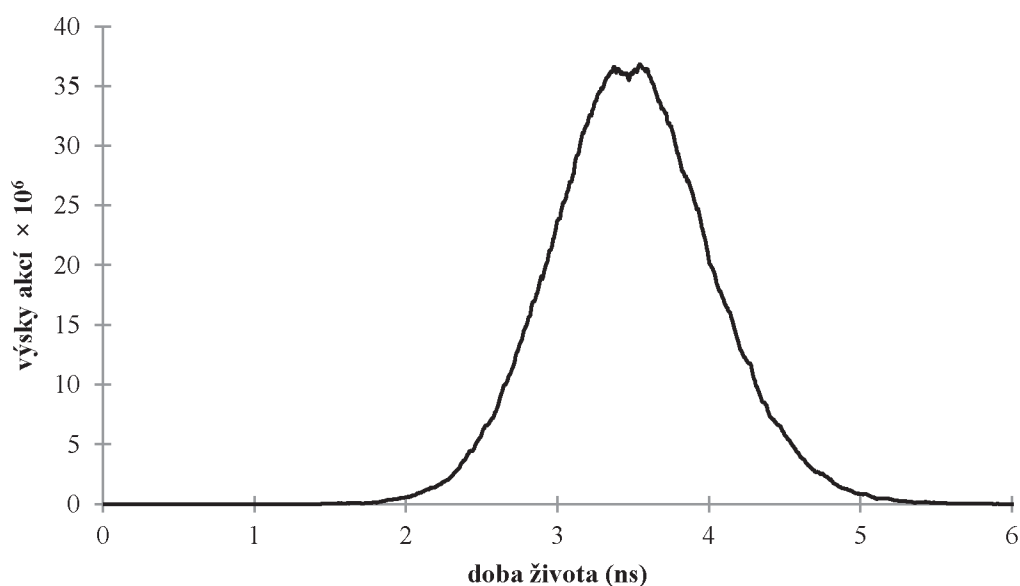


Obr. 45: Snímky z fluorescenčního mikroskopu abaxiálních stran kutikul 11 dní od izolace, enzymatická (vlevo), chemická (vpravo).

Snímky (Obr. 44 a Obr. 45) zobrazují spodní stranu enzymaticky a chemicky izolovaných kutikul, kde můžeme pozorovat značné rozdíly opět ve zbarvení přítomných útvarů. Pokud bychom tato barevně odlišná místa porovnali s barevnou škálou, která se nachází pod snímky, mohli bychom stanovit doby života fluorescence skupin přítomných v jednotlivých druzích kutikul. To, co je na obrázku znázorněno červeným zbarvením, má nejdelší dobu života fluorescence, naopak to co je znázorněno modrou barvou, odpovídá nejkratší době života fluorescence. Z vizuálního hlediska však při srovnání snímků těsně po izolaci a 11 dní od izolace určitě vidíme značné odlišnosti, a to nejen mezi kutikulami izolovanými CHMI a EMI, ale také v markantním pohasínání přítomných skupin na kutikulách.

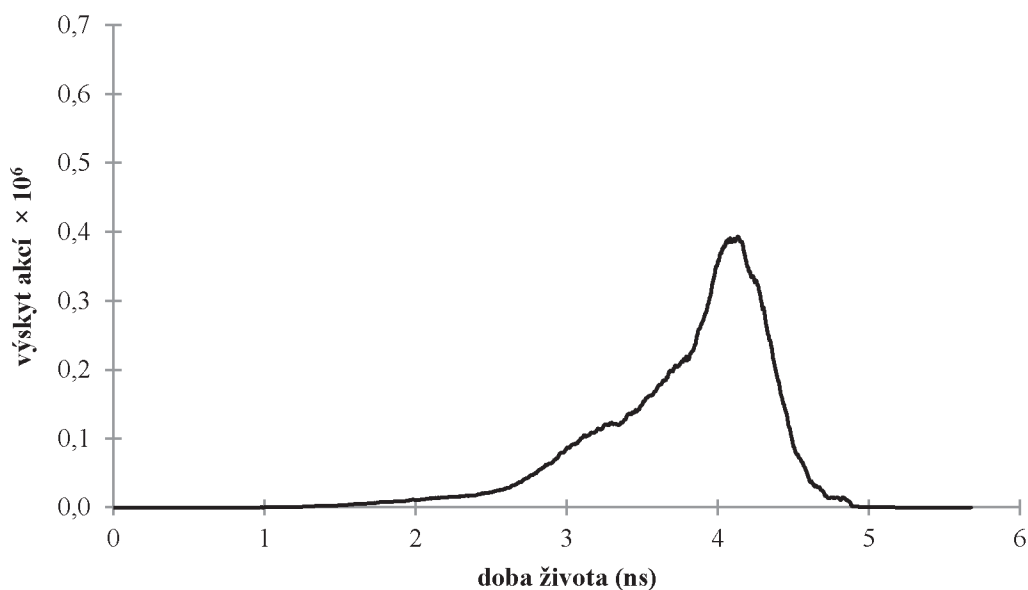


Obr. 46: Distribuční křivka dob života fluorescence skupin obsažených v enzymaticky izolované kutikule (abaxiální) těsně po izolaci.

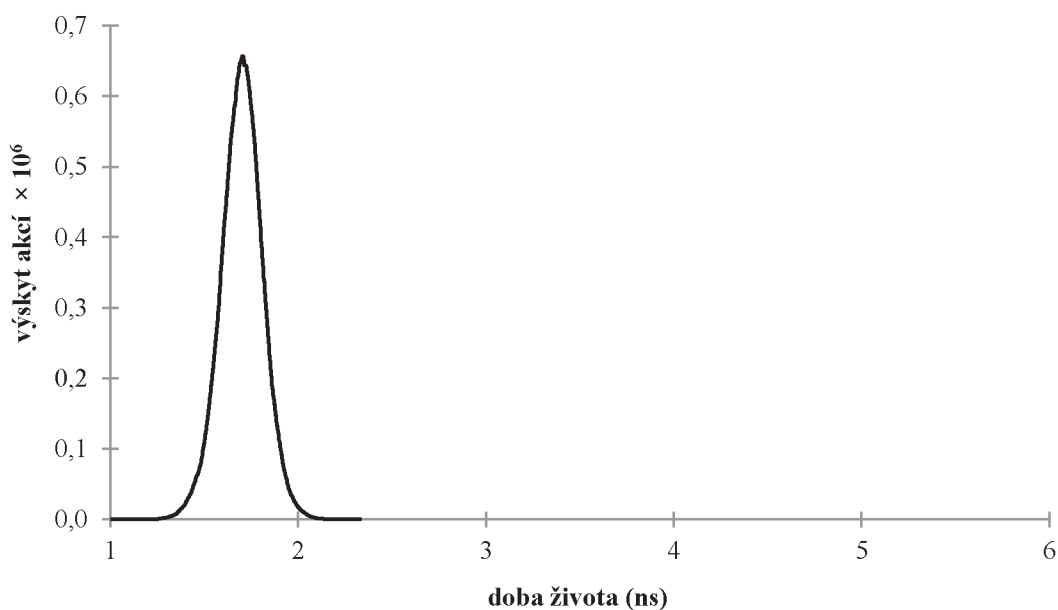


Obr. 47: Distribuční křivka dob života fluorescence skupin obsažených v chemicky izolované kutikule (abaxiální) těsně po izolaci.

Pro objektivní posouzení těchto experimentů bylo opět využito vyhodnocení průběhu distribučních křivek, a tak stanovení hodnot dob života jednotlivých kutikul. Vezmeme-li v úvahu první dva grafy (Obr. 46 a Obr. 47), zjistíme, že nejčastěji zastoupená hodnota doby života fluorescence skupin přítomných na abaxiální straně enzymatické kutikuly odpovídá 4,07 ns. V případě stejné strany připravené metodou chemické izolace dosahuje tato hodnota 3,35 ns. Zde je zřejmé, že již při samotné izolaci musí docházet k „nějakým“ procesům, které ovlivňují funkci kutikul, což se samozřejmě podepíše také na jejich bariérových schopnostech.



Obr. 48: Distribuční křivka dob života skupin obsažených v enzymaticky izolované kutikule (abaxiální) po 11 dnech od izolace.



Obr. 49: Distribuční křivka dob života skupin obsažených v chemicky izolované kutikule (abaxiální) po 11 dnech od izolace.

Pokud vyhodnotíme opět distribuční křivky těchto typů experimentů (Obr. 48 a Obr. 49), zjistíme, že hodnota doby života kutikul izolovaných enzymatickou metodou se po 11 dnech příliš nemění, hodnota tohoto parametru totiž odpovídá 4,04 ns. Naopak v případě chemicky izolovaných kutikul došlo během 11 dní k velkému posunu, neboť pro tento případ byla doba života fluorescence odpovídající maximu distribuční křivky stanovena na hodnotu 1,68 ns.

Na základě těchto výsledků lze tvrdit, že enzymaticky izolované kutikuly se bez účinků LH chovají pořád stejně, z čehož můžeme usoudit, že transportní procesy by měly probíhat po celých 14 dní stejně. Avšak tohle nemůžeme s jistotou tvrdit u chemicky izolovaných kutikul,

u nichž vidíme, že s časem dochází k pohasínání funkčních skupin v kutikule a tedy předpokládáme, že se bude měnit také průběh penetrace lignohumátu.

Výsledkům difúzních experimentů zaměřených na transport lignohumátu přes rostlinné kutikuly a stanovení objektivních transportních parametrů je podrobně věnována pozornost v Kapitole 6.3.

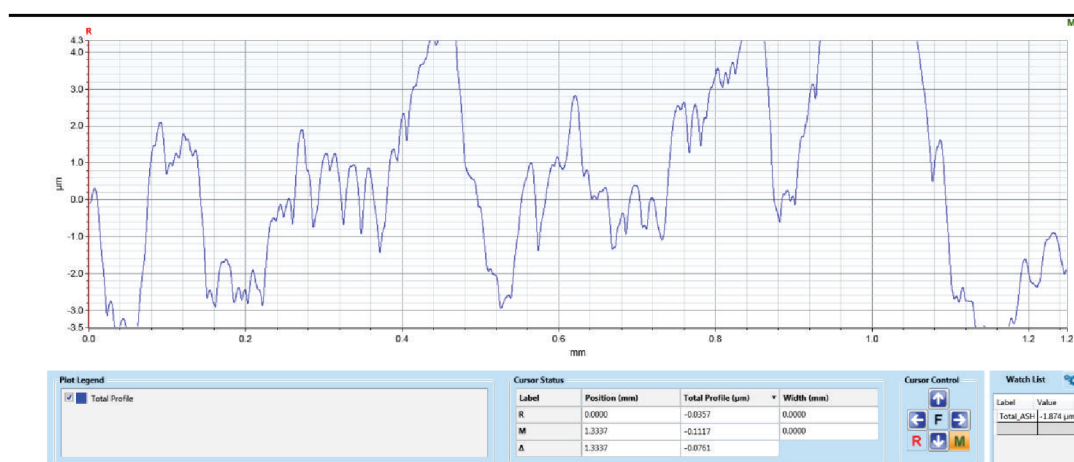
Profilometrie rostlinných kutikul

Díky profilometrii byly naměřeny tloušťky a profil povrchu rostlinných kutikul (CHIK a EIK). Principem a nastavením jsme se zabývali již v Kapitole 5.5.1. Separované a očištěné rostlinné kutikuly byly nanесeny na mikroskopické sklíčko, na které byly umístěny vždy 3 stejné vzorky kutikul. Celkem tedy byly připraveny 4 mikroskopická sklíčka po 3 vzorcích pro EIK (abaxiální a adaxiální strana) a CHIK (abaxiální a adaxiální strana). Na základě získaných výsledků, které byly sepsány v Příloze 10, jsme byli schopni stanovit tloušťku kutikul a jejich povrchovou homogenitu resp. drsnost. Výsledky z měření byly sepsány do Tab. 6.

Tab. 6: Průměrné hodnoty tloušťky kutikul

kutikuly	Ø tloušťka (µm)			průměr (µm)
enzymatická spodní	3,005	3,045	2,574	(2,875 ± 0,262)
enzymatická svrchní	4,197	3,473	2,703	(3,458 ± 0,747)
chemická spodní	–	3,894	4,099	(4,000 ± 0,145)
chemická svrchní	3,026	3,111	2,402	(2,846 ± 0,387)

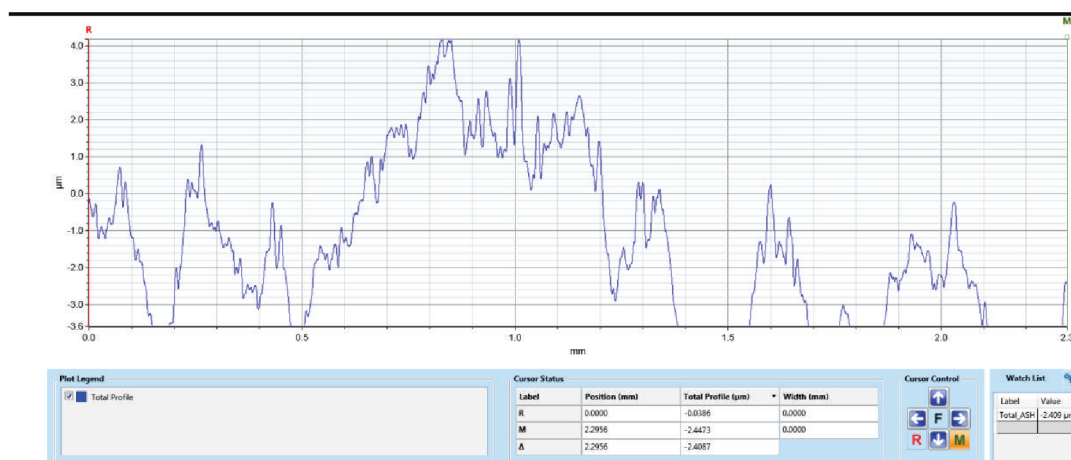
V případě měření svrchních kutikul izolovaných chemickou metodou (Příloha 11) si můžeme všimnout velkých rozdílů v hodnotách tloušťky kutikul, což je způsobené tím, že povrch těchto kutikul je výrazně rozmanitý a nehomogenní. O nehomogenitě povrchu přírodních bariér se můžeme také přesvědčit z pořízených snímků měření (Obr. 50 a Obr. 51).



Obr. 50: Snímek nehomogenního povrchu spodní kutikuly izolované enzymatickou metodou získaného z profilometrického měření.

Z obou těchto obrázků (Obr. 50 a Obr. 51) je patrná křivka, která znázorňuje rozsáhlé výkyvy v profilu povrchu kutikul. Tyto nehomogenní místa mohou být způsobeny nějakými

nečistotami, krystalky apod. Obdobný průběh byl pozorován také v případě studovaných kutikul, které byly izolovány chemickou metodou. Snímky z těchto měření jsou k dispozici v Příloze 11.



Obr. 51: Snímek nehomogenního povrchu svrchní kutikuly izolované enzymatickou metodou získaných z profilometrického měření.

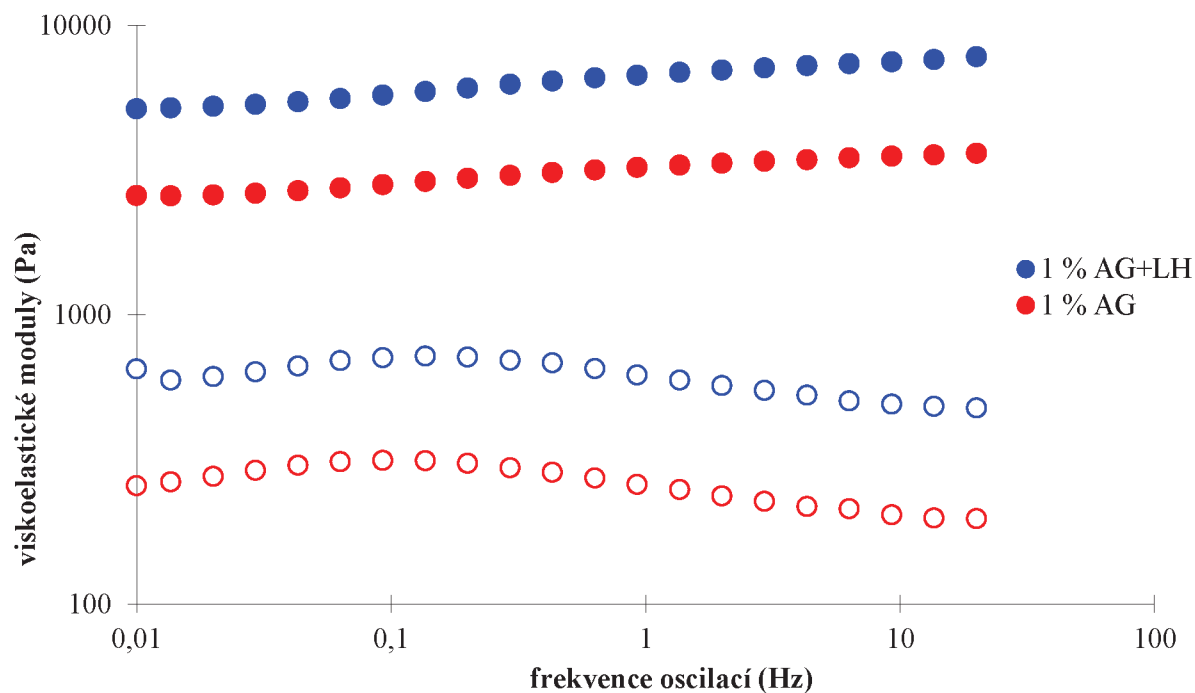
6.2.2 Charakterizace biopolymerních hydrogelů

Reologické studie hydrogelových materiálů

Hlavním cílem tohoto experimentu bylo posoudit, zda existují rozdíly v mechanických vlastnostech agarózových hydrogelů s přídavkem a bez přídavku komerčního přípravku na bázi huminových látek. V případě výrazných odlišností v mechanických vlastnostech by bylo možné očekávat rozdíly také v transportním chování obou typů hydrogelů. Mechanické vlastnosti zkoumaných hydrogelů byly posuzovány především na základě hodnot komplexních modulů elastického (paměťového) G' a viskózního (ztrátového) G'' .

Oscilační frekvenční test (Obr. 52) jasně naznačuje, že 1 hm. % agarózový hydrogel s přídavkem lignohumátu disponuje o něco rigidnější strukturou ve srovnání se stejně koncentrovaným čistým agarózovým hydrogelem bez přídavku LH. Nicméně rozdíly nejsou nikterak markantní. Za zmínku také stojí, že oba zkoumané materiály na bázi agarózy disponovaly viskoelastickým charakterem s převahou elasticity na úkor viskózního modulu ($G' > G''$) v celém měřeném rozsahu frekvencí, což je zcela typické pro hydrogelové materiály.

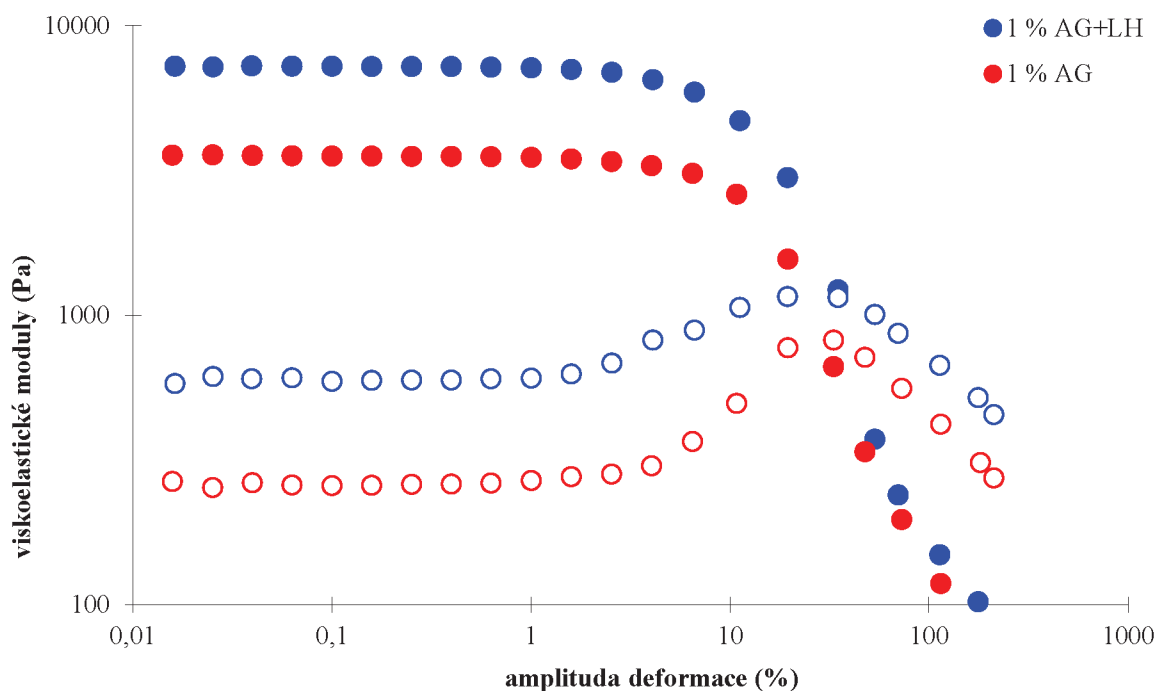
Zajímavým poznatkem jsou rozdíly v hodnotách elastického a viskózního modulu pro jednotlivé vzorky. Zatímco pro čistý agarózový hydrogel je rozdíl v elastickém a viskózním modulu přibližně 3 000 Pa, pro agarózový gel s přídavkem lignohumátu je tento rozdíl přibližně 6 000 Pa. Lze tedy tvrdit, že přídavek lignohumátu do struktury agarózového hydrogelu mírně ovlivňuje mechanické vlastnosti připravených materiálů. Struktura hydrogelu z mechanického hlediska je tedy rigidnější a nepoddajnější deformaci. Tento fakt může ovlivňovat hodnoty naměřených difúzních koeficientů, vzhledem k tomu, že se dá očekávat pokles difuzivity rozpuštěných látek v hydrogelu se vzrůstající rigiditou struktury.



Obr. 52: Frekvenční test. Závislost elastického modulu G' (plné body) a viskózního modulu G'' (prázdné body) na frekvenci oscilací.

Druhým testem byl tedy oscilační test deformačního typu. Jak je patrné z Obr. 53, při nižších amplitudách deformací je vnitřní síť agarózových hydrogelů schopna odolávat vystavenému napětí (po aplikaci napětí se gelovitá síť vrací do původního stavu a takový vzorek se tedy chová elasticky), což je v hodnotách obou komplexních modulů charakteristické tím, že moduly jsou nezávislé na amplitudě deformace. V případě 1 hm. % agarózového hydrogelu bez přídavku lignohumátu je lineární viskoelastická oblast v rozmezí 0,01 % – 4 % amplitudy deformace, zatímco pro 1 hm. % agarózový hydrogel s přídavkem lignohumátu je lineární viskoelastická oblast v rozmezí 0,01 % – 1 %. Dle tohoto testu lze tedy tvrdit, že síla vazby (jednotlivých uzlů) je tedy pevnější pro čistý agarózový hydrogel bez přídavku lignohumátu.

Na závěr lze tedy říci, že oscilační testy frekvenčního typu prokázaly, že přídavek lignohumátu nezanedbatelný významný vliv na rigiditu připravených hydrogelů (vyšší elasticita), zatímco oscilační deformační testy prokázaly, že síla vazby jednotlivých uzlů je větší pro 1 hm. % agarózový hydrogel s přídavkem lignohumátu ve srovnání s agarózovým hydrogelem bez přídavku lignohumátu. Použité oscilační testy tedy pro oba zkoumané vzorky potvrdily elastický charakter, vzhledem k tomu, že elastický modul ve všech případech převyšoval modul viskózní v celém rozsahu měřených oscilačních frekvencí. Mobilita komplexních huminových látek v agarózových hydrogelech může být ovlivněna právě změnou mechanických vlastností agarózových hydrogelů.

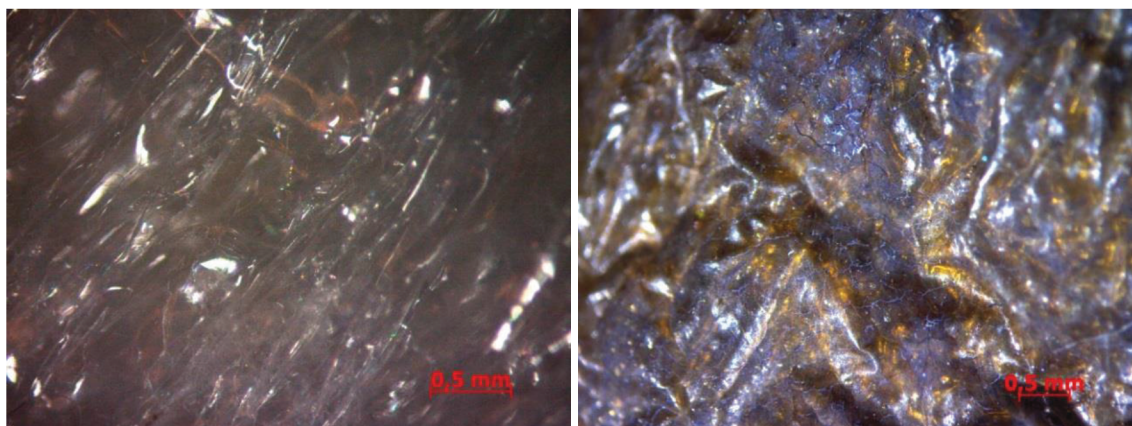


Obr. 53: Deformační test. Závislost elastického modulu G' (plné body) a viskózního modulu G'' (prázdné body) na amplitudě deformace.

Stereomikroskopické studie hydrogelových materiálů

Agaróзовые hydrogely byly podrobeny studii na stereomikroskopu, která vedla k získání snímků hydrogelů (čistého a s obsahem 1 hm. % lignohumátu). Tyto hydrogelové materiály byly před měřením zlyofilizovány (Obr. 25), čím vznikla porézní hmota, která byla nařezána a podrobena stereomikroskopickému zkoumání.

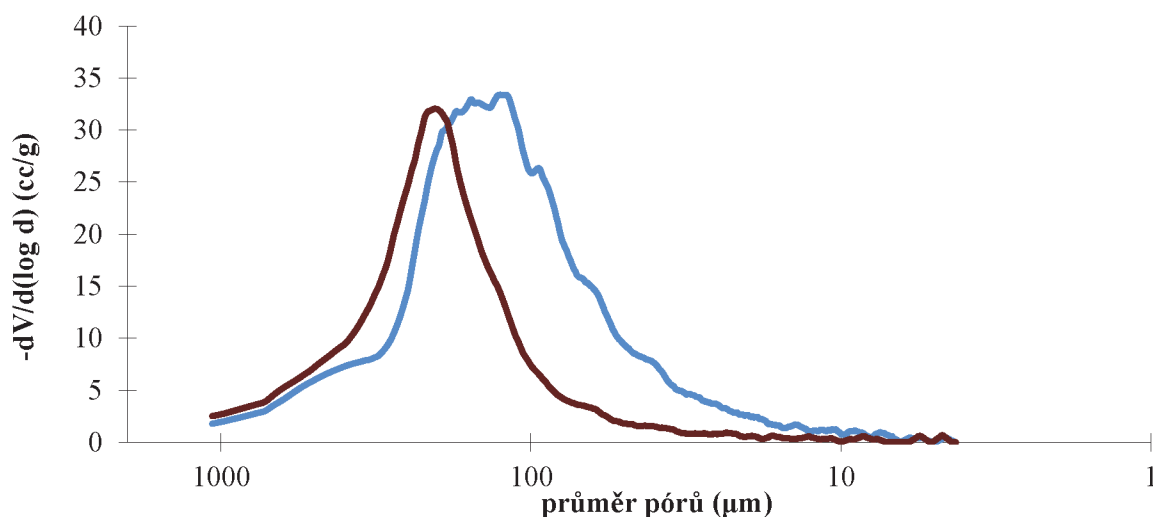
Výstupem z těchto měření byly 3D snímky ilustrující morfologii povrchů xerogelů (Obr. 54). Ze snímků je zřejmé, že lyofilizované vzorky hydrogelů disponují odlišným povrchem. Hydrogely připravené pouze z 1 hm. % AG (Obr. 54 – vlevo) mají povrch mnohem hladší a méně členitý, než je tomu v případě hydrogelů obsahujících navíc příměs 1 hm. % LH (Obr. 54 – vpravo). Dále můžeme na povrchu vysušených hydrogelů (s obsahem LH) pozorovat „jakési modré zesíťování“, které u čistých hydrogelů není přítomné.



Obr. 54: Morfologie povrchů lyofilizovaných hydrogelů – 1 hm. % agaróza (vlevo), 1 hm. % agaróza s příměsí 1 hm. % LH (vpravo).

Rtut'ová porozimetrie hydrogelových materiálů

Prostřednictvím MIP metody byla vyhodnocena distribuce velikosti pórů agarózových hydrogelů (1 hm. % agaróza, 1 hm. % agaróza s příměsí 1 hm. % lignohumátu), čímž byla získána další důležitá charakteristika těchto materiálů. Stanovení hodnoty velikosti pórů v těchto difúzních materiálech má pro nás velký význam z hlediska transportních procesů. Výrazná odlišnost obou hydrogelů ve velikosti pórů by nevyhnutelně vedla k odlišnosti v rychlosti transportu aktivní látky (lignohumát) v těchto prostředích. Výstupem této metody bylo grafické znázornění distribuce pórů (Obr. 55).



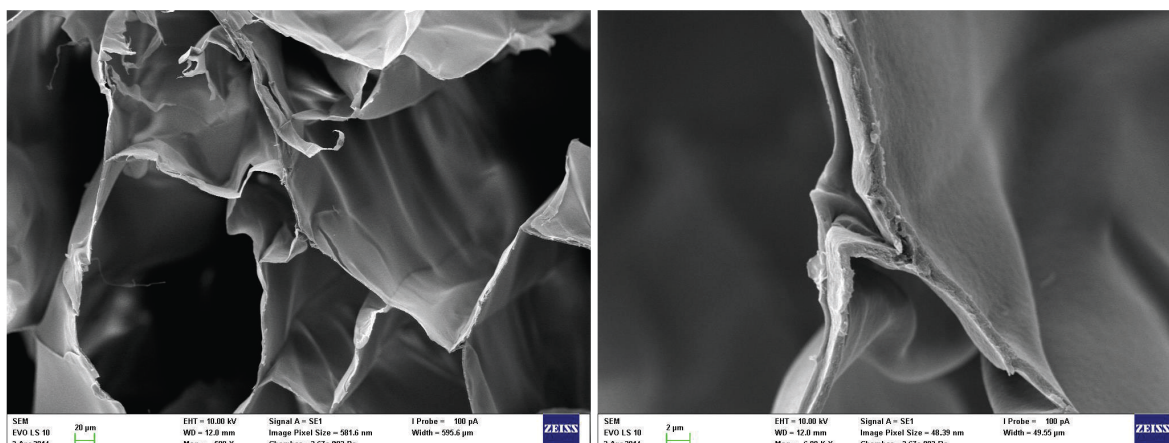
Obr. 55: Distribuční křivky velikosti pórů přítomných v agarózových hydrogelech. Modrá křivka (1 hm. % agaróza) a hnědá křivka (1 hm. % agaróza s 1 hm. % LH).

Na Obr. 55 je znázorněn průběh distribučních křivek, kde můžeme pozorovat nepatrný posun ve velikostech pórů přítomných v hydrogelových materiálech. Modrá křivka znázorňuje průběh distribuce pórů čistých agarózových hydrogelů a hnědá křivka distribuci pórů agarózových hydrogelů s příměsí lignohumátu. Posun, který můžeme pozorovat je však poměrně zanedbatelný, budeme-li brát v úvahu měřítko (řády), ve kterém jsou křivky zobrazeny. Na základě tohoto stanovení můžeme tvrdit, že oba typy hydrogelů obsahují řádově stejné velikosti pórů, takže by nemělo docházet k rozdílům v transportu lignohumátu v obou prostředích způsobených rozdílnými sterickými efekty gelové sítě.

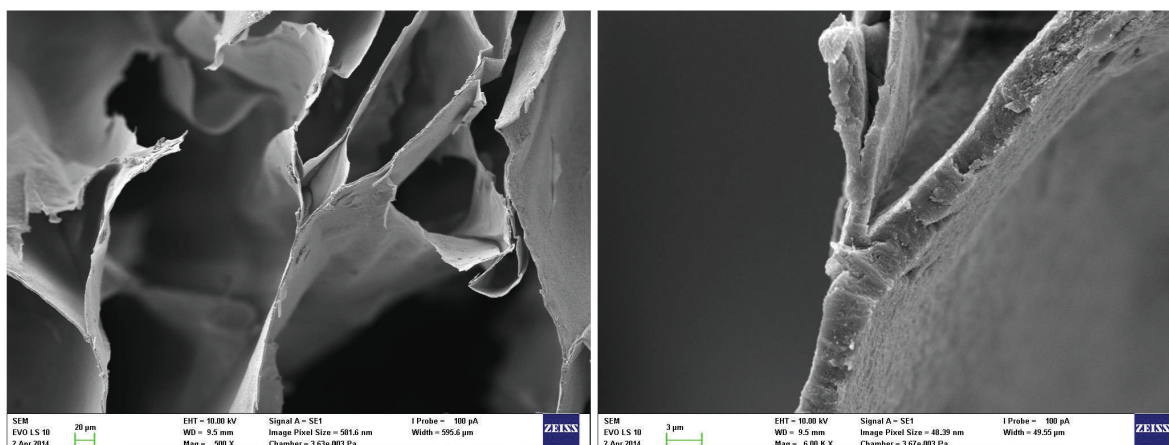
Zároveň jsme mohli porovnat rozdíly ve velikostech pórů mezi těmito hydrogelovými materiály a rostlinnými kutikulami. Průměrná velikost pórů přírodních bariér odpovídá řádově 10 μm, kdežto hydrogelové materiály dosahují hodnoty 100 μm. Z tohoto je patrné, že v difúzních experimentech bude hlavní bariérou transportu představovat kutikula, zatímco porézní struktura hydrogelů se na zpomalení transportu podepíše výrazně menší měrou. (Kapitola 6.3).

Skenovací elektronová mikroskopie hydrogelových materiálů

Poslední metoda, která byla využita pro charakterizaci hydrogelových materiálů byla skenovací elektronová mikroskopie (SEM), díky níž byly získány snímky znázorňující rozdíly morfologie obou typů hydrogelů. Tato metoda měla přispět k ilustraci vnitřní struktury agarózových materiálů bez resp. s příměsí lignohumátu (Obr. 56).



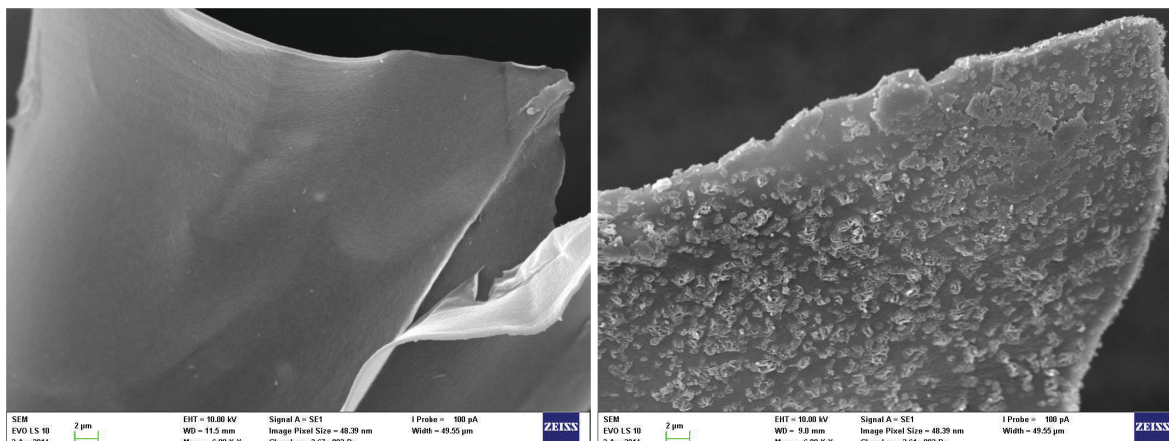
Obr. 56: Snímky čistého agarózového hydrogelu ze SEM. Struktura hydrogelu (vlevo), snímek pořízen s 500-ti násobným zvětšením a s měřítkem 20 µm. Příčný řez čistým agarózovým hydrogelem (vpravo). Snímek pořízen se 6 000 násobným zvětšením a s měřítkem 2 µm.



Obr. 57: Snímky agarózového hydrogelu s příměsí 1 hm. % LH ze SEM. Struktura hydrogelu (vlevo), snímek pořízen s 500-ti násobným zvětšením a s měřítkem 20 µm. Příčný řez hydrogelem s obsahem LH (vpravo). Snímek pořízen se 6 000 násobným zvětšením a s měřítkem 3 µm.

Agarózové hydrogely zaznamenané na snímcích (Obr. 56 a Obr. 57 – vlevo) nevykazují nijak výrazný rozdíl ve svých vnitřních strukturách. Z fotografií je patrný rozdíl v povrchu stěn lyofilizovaných hydrogelů obou typů. Pokud se však zaměříme detail snímků (Obr. 58), zjistíme, že povrch těchto materiálů je značně odlišný, čisté agarózové hydrogely se vyznačují hladkou strukturou (vlevo), kdežto druhý typ materiálu obsahující přídavek LH je drsnější (vpravo).

Rozdíl v drsnosti studovaných hydrogelových materiálů můžeme pozorovat také na snímcích (Obr. 56 a Obr. 57 – vpravo) resp. na jejich příčném průřezu. Čistý hydrogel se vyznačuje hladkým řezem, kdežto hydrogely s příměsí LH jsou opět nerovnoměrné. Další vlastnost, kterou můžeme ze snímků (Obr. 56 a Obr. 57 – vlevo) pozorovat, je také křehkost vzorků. Ačkoli z reologického hlediska se jako rigidnější struktury prokázaly hydrogely s obsahem lignohumátu. Z těchto fotografií je patrné, že xerogely připravené pouze z agarózy mají hladší povrch na průřezu materiálem, oproti hydrogelům s příměsí LH. Tento jev můžeme pozorovat také na hranách materiálů ze snímků (Obr. 58).



Obr. 58: Snímky povrchu hydrogelových materiálů. 1 hm. % agarózový hydrogel (vlevo) a 1 hm. % agarózový hydrogel s příměsí 1 hm. % LH (vpravo). Snímky byly pořízeny se zvětšením 6 000×.

Ačkoli bylo touto metodou prokázáno, že mezi materiály jsou patrné rozdíly, což z hlediska studie těchto materiálů je pro nás velmi přínosná a důležitá informace, tak z hlediska difúzních experimentů by neměly způsobovat žádné výrazné ovlivnění.

6.3 Difúzní experimenty

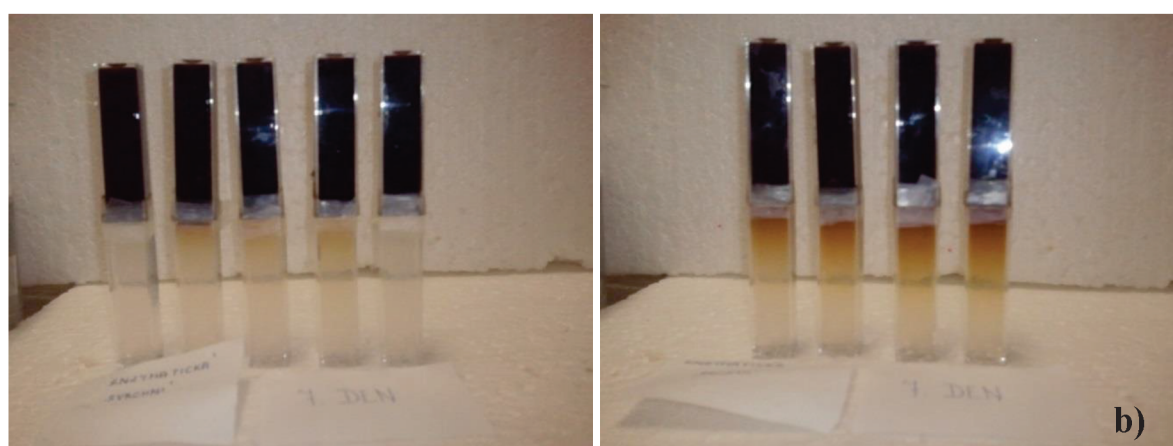
6.3.1 Studium transportu HL skrz kutikulu metodou difúzního páru

Vizuální hodnocení difúze huminových látek přes kutikuly

Pro studium transportních procesů huminových kyselin přes rostlinné kutikuly byla optimalizována metoda difúzního páru, která je založena na dvou hydrogelových prostředích, přijímacím gelu (1 hm. % AG) a zdrojovém gelu (1 hm. % AG a 1 hm. % LH). Mezi tyto dva hydrogelové materiály byla upevněna rostlinná kutikula a připravené difúzní páry byly vloženy do exikátoru s vodou, aby byla udržována konstantní vlhkost vzorků a tím pádem eliminováno vysychání hydrogelů a kutikul.

Difúzní páry byly studovány po dobu 12 dní vizuálně a také objektivně (Kapitola 6.3.2). Vizuálním pozorováním studovaných experimentů jsme se mohli přesvědčit o funkčnosti této navržené metody (difúzní pár) a zároveň našim cílem bylo porovnat tato pozorování s objektivní metodou, kterou jsme si pro tento typ experimentu zvolili (UV-VIS spektrofotometrické stanovení koncentračního profilu lignohumátu v přijímacím gelu).

Na Obr. 59 jsou znázorněny snímky ze zmíněných difúzních experimentů, pro názornost byla vybrána fotografie po 2 dnech difúze LH resp. po 7 denní difúzi přes rostlinné kutikuly.

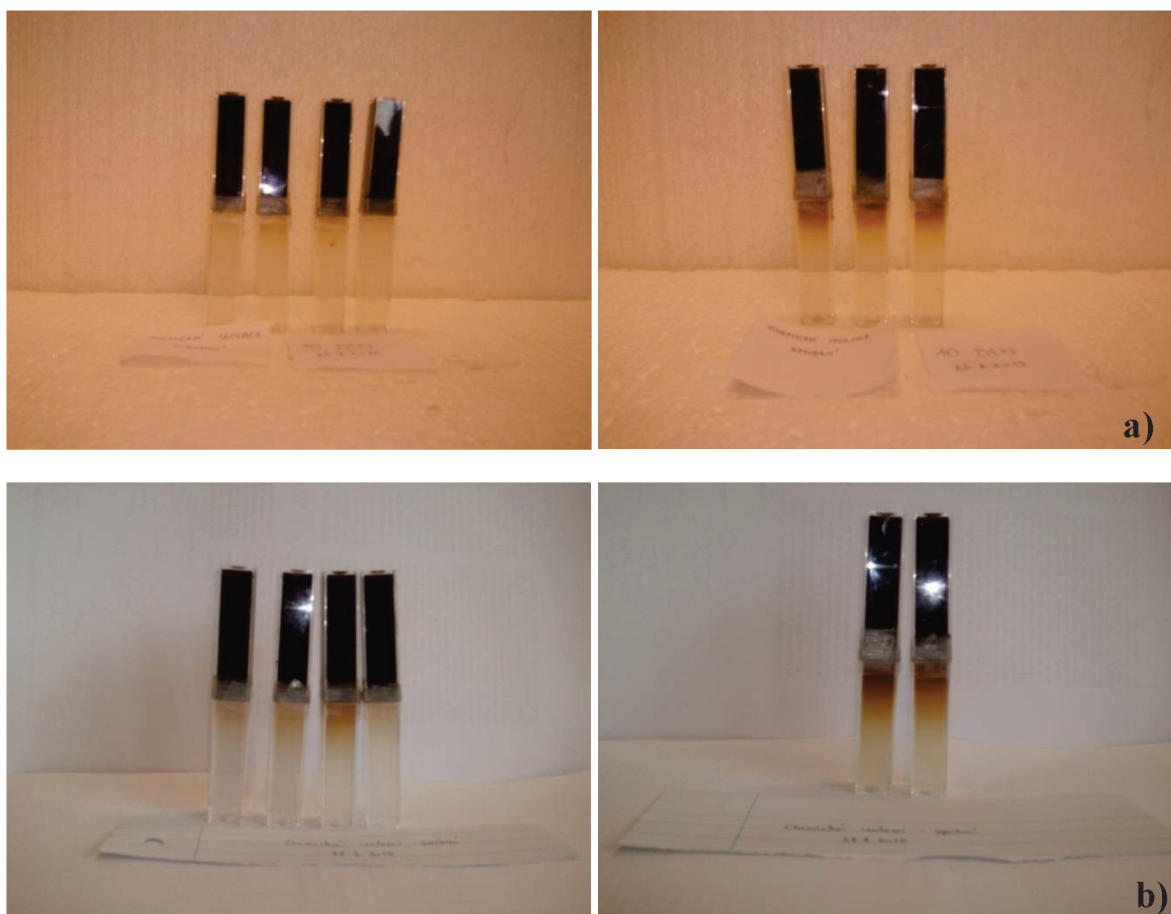


Obr. 59: Vizuelní pozorování difúzních procesů pro enzymaticky izolované kutikuly – svrchní (vlevo), spodní (vpravo) – a) 2 dny, b) 7 dní.

Ze snímků je patrný jak transkutikulární přechod lignohumátu do přijímacího hydrogelu, tak také odlišné chování prostupu studované látky přes spodní a svrchní kutikuly (Obr. 59). Pro vizuelní posouzení bariérových schopností CHIK byly opět vybrány fotografie (Obr. 60) difúzních experimentů, které probíhaly po stejnou dobu, jako tomu bylo v případě kutikul izolovaných EMI.

Ze snímků (Obr. 60) je opět zřejmý rozdíl v penetraci lignohumátu přes rostlinné kutikuly mezi svrchními a spodními kutikulami, kdy svrchní kutikuly pomaleji podléhají difúzi, než v případě spodních kutikul. Také u těchto difúzních experimentů můžeme pozorovat penetraci LH v čistém agarózovém gelu po 2 a 7 dnech.

V případě srovnání difúzních procesů LH u abaxiálních a následně také u adaxiálních stran chemicky a enzymaticky izolovaných kutikul (Příloha 12) můžeme zpozorovat patrný rozdíl v rychlosti difúze. Chemicky izolované kutikuly se na základě vizuelního pozorování jeví jako materiály s rychlejším vstupem LH.



Obr. 60: Vizuelní pozorování difúzních procesů pro chemicky izolované kutikuly – svrchní (vlevo), spodní (vpravo) – a) 2 dny, b) 7 dnů.

Stanovení difúzního koeficientu huminových látek

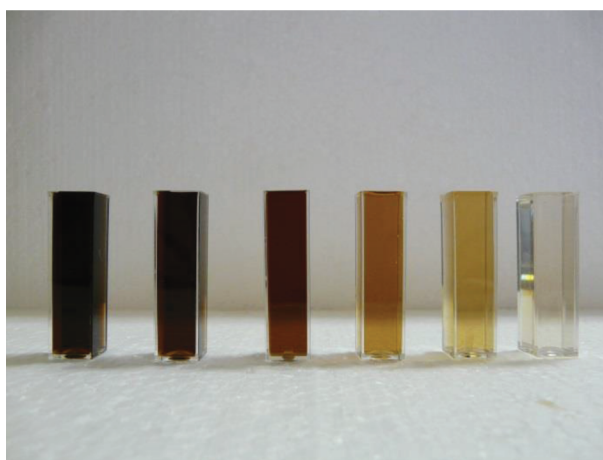
Vizuální posouzení transportních procesů naznačilo základní odlišnosti v bariérovém chování jednotlivých typů kutikul, neumožňují však objektivně kvantifikovat rychlost difúzního prostupu. Za tímto účelem byly v dalším kroku vyhodnoceny difúzní experimenty, stanoveny tzv. efektivní difúzní koeficienty D_{eff} , které se od toho klasického liší tím, že zahrnuje vliv porozity a tortuozity. Ty slouží jako univerzální parametr, popisují rychlost difúze a umožňují tak objektivně porovnat bariérové schopnosti jednotlivých typů studovaných kutikul.

Kyvety přijímacího gelu byly proměřeny na UV-VIS spektrofotometru Varian Cary 50 (Příloha 3), kde bylo využito posuvného nástavce (Příloha 4), který umožňuje proměření přijímacích kyvet v různých vzdálenostech od jejich rozhraní s kutikulou. Výsledkem měření byly UV-VIS spektra, která byla využita pro stanovení koncentračních profilů lignohumátů v přijímacích gelech, k jejichž dalšímu zpracování bylo použito modelu volné difúze (Rovnice 5).

Kalibrační křivka

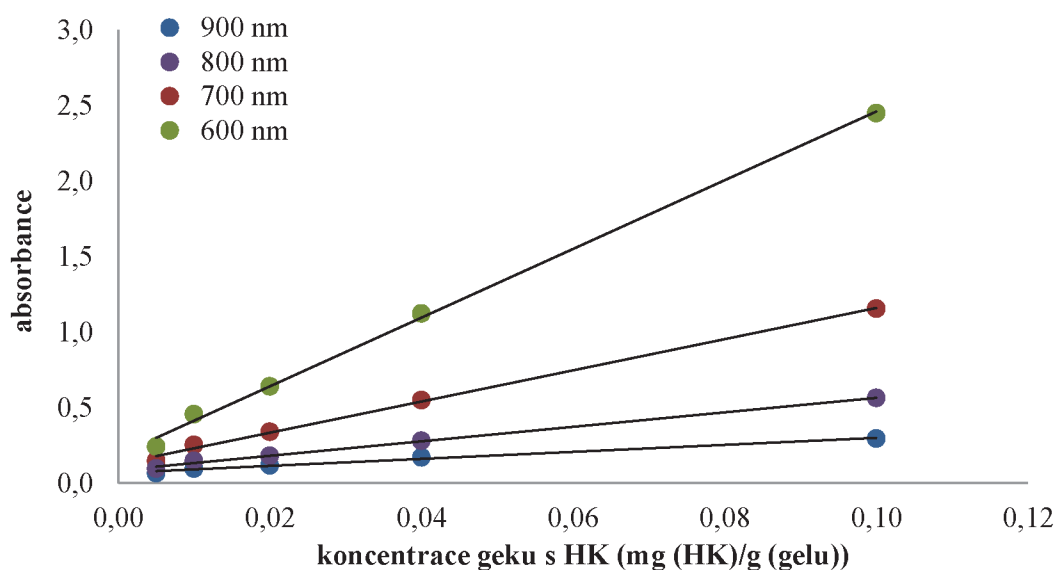
Pro vyhodnocení UV-VIS spekter a tedy stanovení hodnoty difúzního koeficientu, bylo zapotřebí sestavit kalibrační křivku pro výpočet koncentrace lignohumátu v hydrogelu, proto byly připraveny agaróзовé hydrogely s definovaným přídatkem lignohumátu a následně

stanoveny UV-VIS spektra hydrogelů s obsahem 1 hm. % agarózy a 0,1 hm. %, 0,05 hm. %, 0,04 hm. %, 0,02 hm. %, 0,01 hm. % resp. 0,005 hm. % lignohumátu (Obr. 61). Příprava této koncentrační řady probíhala obdobným způsobem, jako je popsáno v Kapitole 5.5.1.



Obr. 61: Kalibrační vzorky agarózových hydrogelů (1 hm. %) s obsahem 0,1 hm. %, 0,05 hm. %, 0,04 hm. %, 0,02 hm. %, 0,01 hm. % resp. 0,005 hm. % lignohumátu.

Po ztuhnutí těchto hydrogelů, byly homogenně zbarvené kyvety proměřeny na UV-VIS spektrofotometru, a tak byla získána UV-VIS spektra kalibrační křivky, čímž mohla být vynesena závislost absorpance na koncentraci hydrogelu s obsahem LH. Výsledkem byla kalibrační křivka, která je uvedena na Obr. 62.

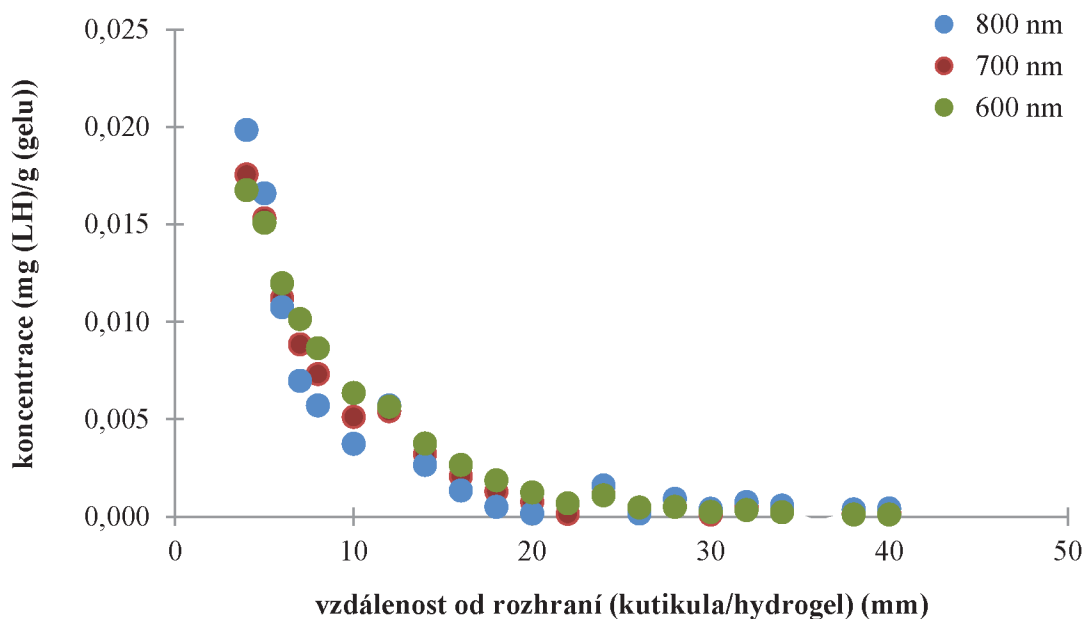


Obr. 62: Kalibrační křivka.

Z tohoto grafu (Obr. 62) je zřejmé, že kalibrační křivky potvrzují Lambert–Beerův zákon, tedy lineární závislost absorpance na koncentraci barevné složky. Tyto křivky však nevycházejí z nuly, což je způsobeno přítomností agarózového hydrogelu, který absorbuje a rozptyluje také určité množství záření z UV-VIS oblasti (slepým vzorkem při stanovování byla destilovaná voda).

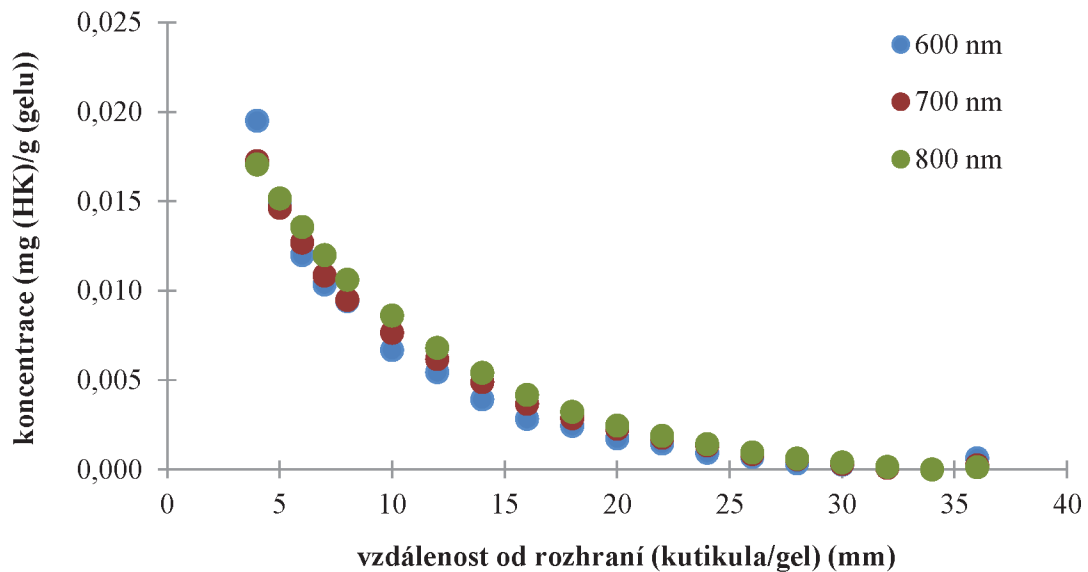
Koncentrační profil lignohumátu v přijímacím hydrogelu

Na základě grafu kalibrační křivky (Obr. 62) bylo možné provést vyhodnocení studovaných vzorků. UV-VIS spektra v přijímacích kyvetách po kroku 1 mm (respektive 2 mm ve větších vzdálenost od rozhraní kutikula/hydrogel). Vzhledem k tomu, že s časem difúze docházelo k stále většímu zakoncentrování přijímacího hydrogelu na rozhraní (kutikula/gel), byla absorbance lignohumátu v hydrogelu v těsné blízkosti rozhraní tak vysoká, že nebylo možné koncentraci LH v prvních 5 mm přijímacím hydrogelu stanovit. Na základě tohoto zjištění nebyly tyto počáteční milimetry zahrnuty do vyhodnocování.



Obr. 63: Koncentrační profil abaxiální strany enzymaticky izolovaných kutikul.

Z rovnice lineární regrese kalibrační křivky byly vypočteny koncentrace v jednotlivých polohách přijímacího hydrogelu. Výsledná koncentrace poté byla získána jako průměrná hodnota všech koncentrací stanovených při vlnové délce 600, 700 a 800 nm. Na Obr. 63 je uveden příklad vyhodnocení koncentračního profilu pro abaxiální EIK, která byla ponechána k penetraci po dobu 144 hod. Naopak na Obr. 64 je uveden příklad abaxiální CHIK, která byla ponechána transportu huminových kyselin 134 hodin.



Obr. 64: Koncentrační profil abaxiální strany chemicky izolovaných kutikul.

Výpočet efektivního difúzního koeficientu

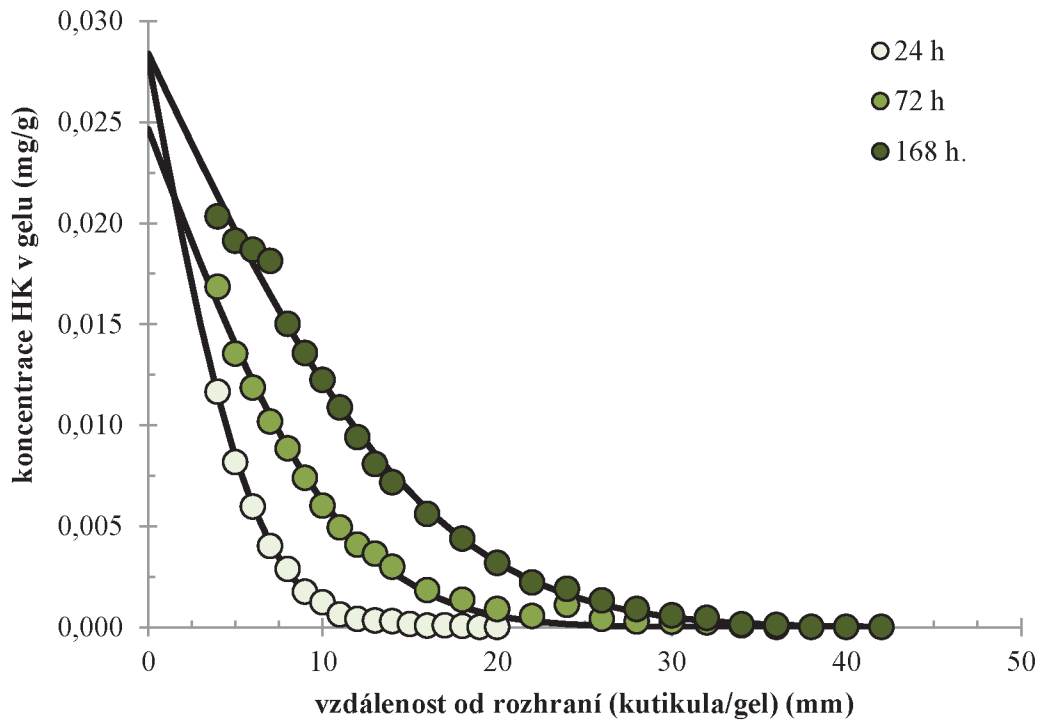
Pro stanovení transportních procesů lignohumátu přes rostlinné kutikuly jsme zvolili jako transportní parametr efektivní difúzní koeficient D_{eff} . Pro stanovení tohoto parametru z celkového transportovaného množství LH skrz rostlinnou kutikulu by bylo zapotřebí změřit spektra v celém rozsahu kyvety, tedy od polohy 45 mm až do 84 mm, což ale v našem případě nebylo možné naměřit. Námi naměřená data byla vyhodnocována pro dráhový posun 50 až 84 mm.

Hodnotu difúzního koeficientu je možné stanovit z experimentálních dat koncentračního profilu, které byly proloženy teoretickou funkcí. Ta odpovídala závislosti koncentrace difundující látky na vzdálenosti od rozhraní (kutikula/gel) v použitém difúzním páru. Tento profil dle zvoleného difúzního modelu popisuje vztah (Rovnice 8):

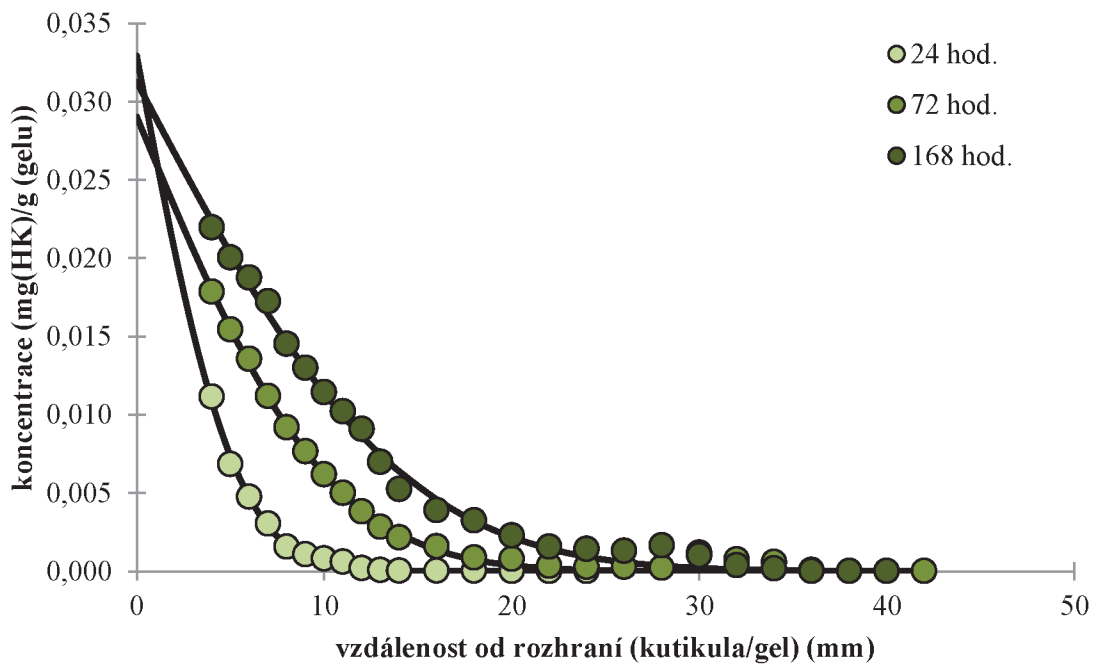
$$c = c_0 \cdot \operatorname{erfc} \sqrt{\frac{x}{4D_{\text{eff}}t}} \quad (8)$$

kde c je koncentrace difundující látky, c_0 je koncentrace na fázovém rozhraní, x je dráha difúze (vzdálenost od rozhraní), D_{eff} je efektivní difúzní koeficient a t je čas difúze.

Proložení koncentračního profilu experimentální části (naměřená data znázorněná zelenými body) teoretickou křivkou se provádí za pomoci iterační metody nejmenších čtverců (Obr. 65 a Obr. 66).



Obr. 65: Stanovení difúzního koeficientu D_{eff} a koncentrace na rozhraní c_0 z koncentračního profilu pro abaxiální strany chemicky izolovaných kutikul.



Obr. 66: Stanovení difúzního koeficientu D_{eff} a koncentrace na rozhraní c_0 z koncentračního profilu pro abaxiální strany enzymaticky izolovaných kutikul.

Ve výsledku byly získány námi hledané parametry, tedy koncentrace na rozhraní (kutikula/hydrogel) c_0 a efektivní difúzní koeficient D_{eff} . Hodnoty těchto veličin byly stanoveny na základě použití nástroje Řešitel z aplikace Microsoft Excel. Vyhodnocení těchto parametrů nalezneme v Tab. 7.

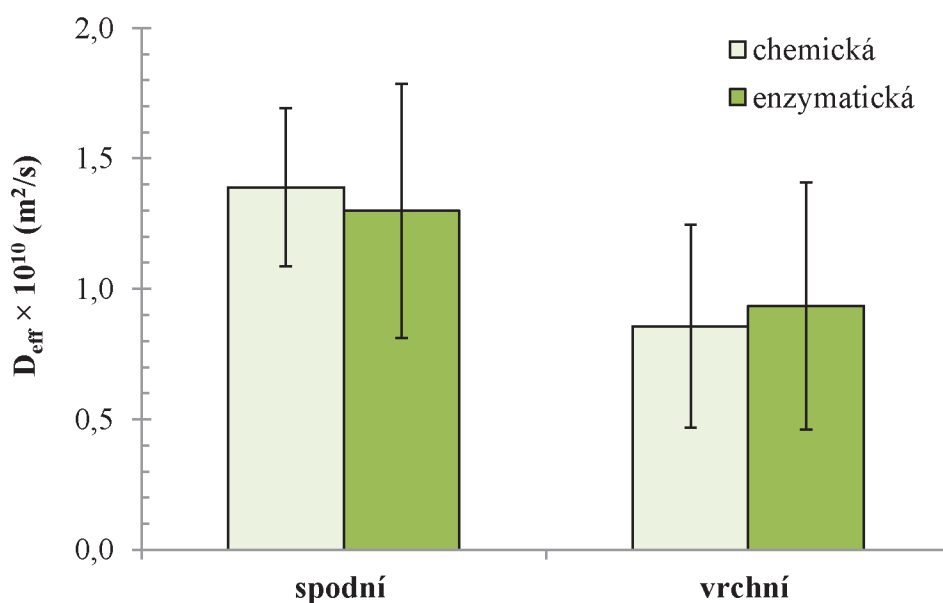
Tab. 7: Souhrn difúzních koeficientů D_{eff} a koncentrací na rozhraní c_0 pro chemicky a enzymaticky izolované kutikuly.

Kutikula	enzymaticky izolovaná		chemicky izolovaná	
	c_0 (mg/g)	$D_{\text{eff}} (\cdot 10^{10} \text{ m}^2/\text{s})$	c_0 (mg/g)	$D_{\text{eff}} (\cdot 10^{10} \text{ m}^2/\text{s})$
spodní	0,131	1,299	0,340	1,388
svrchní	0,047	0,934	0,057	0,856

Z vyhodnocených dat difúzních koeficientů a koncentrací na rozhraní je patrné, že spodní strana listu obsahuje typ kutikul, které jsou schopny lépe vstřebávat vodu a živiny než v případě adaxiálních kutikul, které se nachází na svrchní straně listu. Tento fakt přitom platí, jak pro chemicky, tak pro enzymaticky izolované kutikuly.

Z hlediska koncentrací LH na rozhraní (kutikula/hydrogel) můžeme pozorovat opět rozdíly mezi svrchními a spodními kutikulami, z čehož plyne, že proces difúze v těchto přírodních strukturách probíhá různou měrou. Pro lepší porovnání stanovených efektivních difúzních koeficientů u enzymaticky a chemicky izolovaných kutikul byl vypracován graf (Obr. 67).

Díky tomuto objektivnímu vyhodnocení difúzních experimentů (D_{eff} a c_0) přes rostlinné kutikuly můžeme následně zkorigovat naše subjektivní zhodnocení difúzních experimentů. Chemicky izolované kutikuly jsme na základě vizuálního pozorování hodnotili jako materiály s rychlejším vstupem lignohumátu (Příloha 12), zatímco objektivní hodnocení spíše ukazuje na to, že uvedené odlišnosti různě izolovaných kutikul nejsou statisticky průkazné.



Obr. 67: Porovnání efektivních difúzních koeficientů abaxiálních a adaxiálních stran kutikul izolovaných chemickou a enzymatickou metodou.

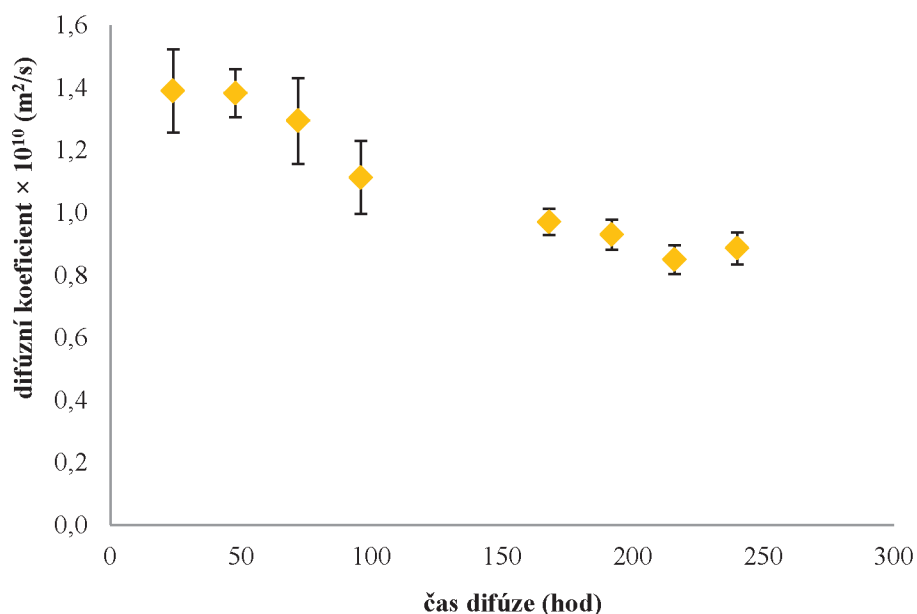
6.3.2 Studium transportu huminových látek skrz standardní membrány

Vzhledem k tomu, že průměrná velikost pórů v kutikulách byla stanovena přibližně na hodnotu 12 μm , rozhodli jsme se tyto experimenty srovnat s nějakým standardem, kterým jsme zvolili syntetické membrány s předefinovanými póry o velikosti 2 a 10 μm . Difúzní experimenty byly prováděny u membrán s póry o velikost 2 μm a to z důvodů velké rozmani-

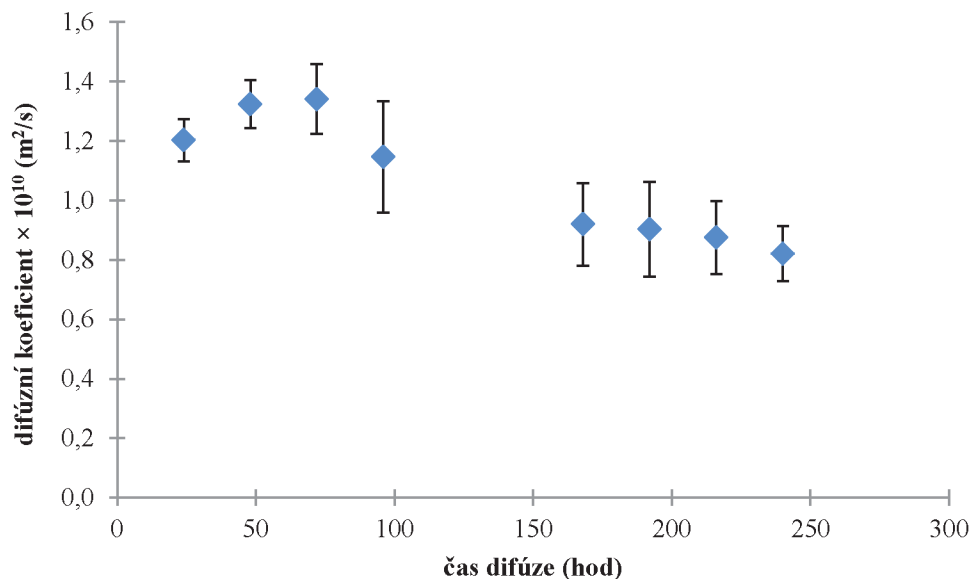
tosti průměrů stomat a také z důvodů srovnání s průměrnou hodnotou velikostí průduchů. Některá stomata v rostlinné kutikule dosahovaly sice velikosti kolem 10 μm , ale jiná jsou zase o mnoho menší, proto byly porovnány experimenty s oběma velikostmi pórů membrán. Postup přípravy je obdobný jako v případě předešlých experimentů, jejichž postup přípravy je uveden v Kapitole 5.5.2. Namísto izolované kutikuly nebyla v tomto případě mezi oba hydrogely upevněna komerční membrána (polykarbonátová, Whatman[®]).

Z hlediska vyhodnocení těchto transportních experimentů se postupovalo naprosto stejně, jako v případě difúzí přes rostlinné kutikuly. Nejprve byly vyhodnoceny koncentrační profily v přijímacích gelech po transportu skrz membrány o velikostech pórů 2 a 10 μm , a poté byl stanoven difúzní koeficient D_{eff} a koncentrace na rozhraní (kutikula/hydrogel) c_0 , kde bylo opět využito *nástroje Řešitel* z aplikace *Microsoft Excel*. Tento postup vyhodnocení je zmíněn v Kapitole 6.3.1. V grafu (Obr. 68 a Obr. 69) byla vynesena závislost efektivního difúzního koeficientu na době, po kterou difúze LH přes membránu probíhala.

Z grafů (Obr. 68) je patrné, že hodnoty efektivních difúzních koeficientů jsou téměř stejné v rámci statistické chyby, což je pravděpodobně způsobeno tím, že velikost molekul lignohumátu je dostatečně malá, aby difúze těchto částic byla ovlivněna pórovitostí membrán.



Obr. 68: Závislosti difúzního koeficientu na době difúze LH přes syntetické membrány s předdefinovanými póry o velikosti 2 μm .



Obr. 69: Závislost difúzního koeficientu na době difúze LH přes syntetické membrány s předefinovanými póry o velikosti 10 μm .

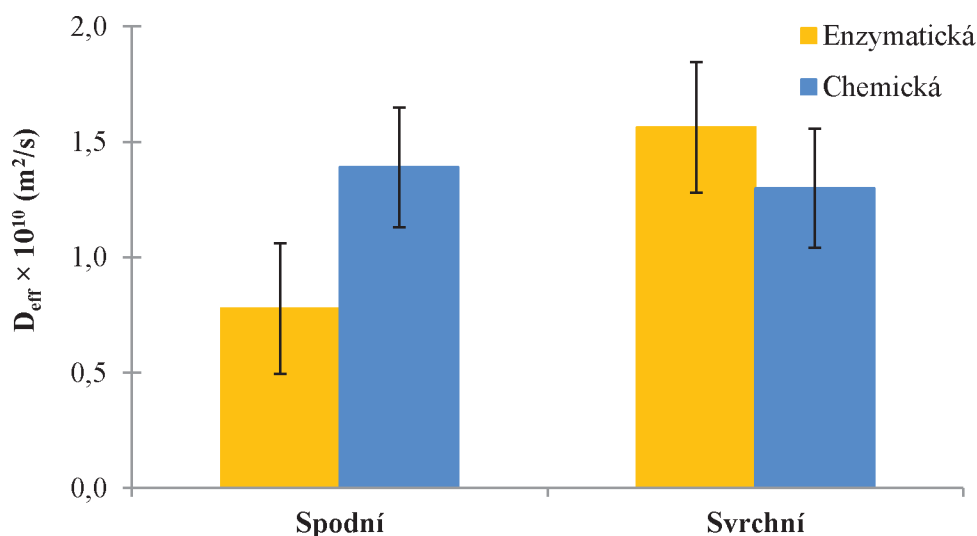
6.3.3 Difúze z roztoku lignohumátu

Transport lignohumátu skrz kutikuly

Difúzní experimenty, při nichž je lignohumát transportován do přijímacího hydrogelu skrz kutikulu ze zdrojového roztoku, jejichž postup je popsán v Kapitole 5.6.2, byla další metoda, která měla modelovat aplikace hnojiv foliárním typem. Zároveň tyto experimenty umožnily paralelní pozorování rostlinných kutikul pod fluorescenčním mikroskopem, jejichž výsledky byly diskutovány v Kapitole 6.2.1.

Celkem bylo připraveno 6 difúzních nádob, v každé nádobě byl přítomen jeden typ zkoumané kutikuly, tedy 2 vzorky pro chemicky a 2 vzorky pro enzymaticky izolované kutikuly. Po 24 hodinách byly agarózové gely proměřovány na UV-VIS spektrofotometru Varian Cary 50 za použití posuvného nástavce.

Výsledkem měření byly UV-VIS spektra, která byla proměřena po kroku 1 mm (resp. 2 mm ve větších vzdálenostech od rozhraní). Tato spektra byla dále zpracována a upravena dle postupu uvedeného v Kapitole 6.3.1, kde výsledkem matematického zpracování byly sloupcové grafy znázorňující difúzní procesy u různých typů kutikul. Díky nástroje Řešitel v aplikaci *Microsoft Excel* mohly být stanoveny hodnoty efektivních difúzních koeficientů (Obr. 70).



Obr. 70: Porovnání efektivních difúzních koeficientů abaxiálních a adaxiálních stran kutikul izolovaných chemickou a enzymatickou metodou.

Pokud porovnáme výsledky z grafu (Obr. 70 a Obr. 67) pak zjistíme, že průběh je naprosto obdobný jako v případě experimentů prováděných přes model difúzního páru. Spodní kutikuly izolované chemickou metodou dosahují vyšší hodnoty efektivního difúzního koeficientu, což znamená, že difúze látek přes tento typ kutikul probíhá rychleji. V případě adaxiálních stran můžeme naopak pozorovat vyšší hodnotu difúzního koeficientu pro enzymaticky izolované kutikuly.

Výsledky efektivních difúzních koeficientů a koncentrací na rozhraní jsou uvedeny v Tab. 8. Na základě tohoto zjištění bychom mohli obě metody (difúzní pár a polonekonečné prostředí) brát jako možné alternativy modelů transportu huminových kyselin přes rostlinné kutikuly.

Tab. 8: Souhrn výsledků difúzních koeficientů D_{eff} a koncentrací na rozhraní c_0 pro chemicky a enzymaticky izolované kutikuly.

Kutikula	enzymaticky izolovaná		chemicky izolovaná	
	c_0 (mg/g)	$D_{\text{eff}} (\cdot 10^{10} \text{ m}^2/\text{s})$	c_0 (mg/g)	$D_{\text{eff}} (\cdot 10^{10} \text{ m}^2/\text{s})$
spodní	0,373	0,779	0,585	1,390
svrchní	0,205	1,562	0,193	1,299

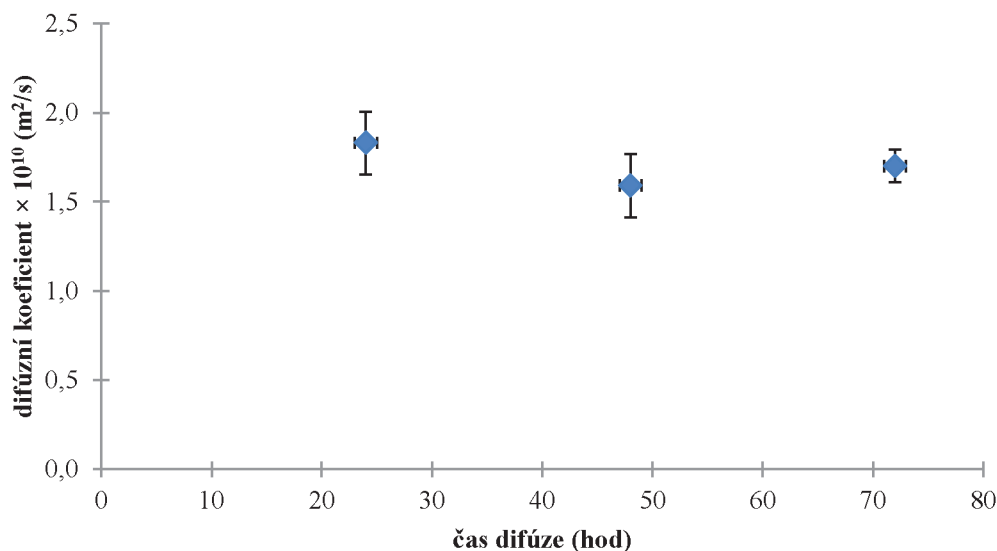
6.3.4 Syntetické membrány s definovanými póry

Tento difúzní experiment sloužil jako srovnávací model předešlého experimentu. Postup experimentu je totožný, jako v případě difúzních experimentů v polonekonečném prostředí (Kapitola 6.3.3), pouze s tím rozdílem, že místo reálných kutikul, byly použity syntetické membrány s póry o velikosti 2 a 10 μm , jakožto difúzní bariéry.

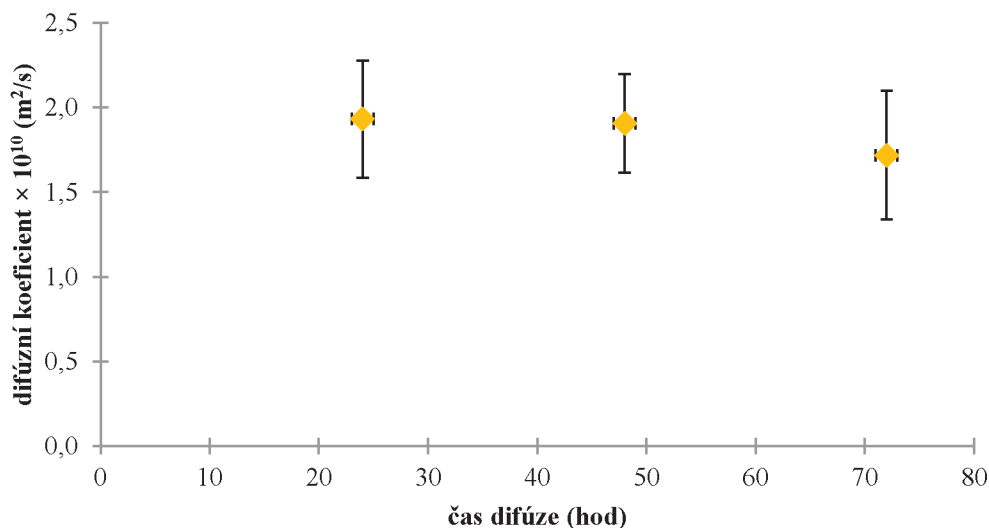
Opět bylo vytvořeno 6 difúzních nádob, které obsahovaly vždy po 4 ks stejných vzorků, přičemž byly tyto agarózové hydrogely proměřovány na UV-VIS spektrofotometru opatřeného posuvným nástavcem, který umožňuje měření UV-VIS spekter v různých místech květy. Z těchto naměřených dat byly opět matematicky získány hodnoty efektivního

difúzního koeficientu D_{eff} a koncentrace na rozhraní c_0 , k jejichž stanovení bylo využito analogických postupů, které jsme již zmiňovali výše (Kapitola 6.3.1).

Výsledkem měření jsou dva grafy (Obr. 71 a Obr. 72) znázorňující závislost efektivního difúzního koeficientu na čase difúze.



Obr. 71: Závislosti difúzního koeficientu na době difúze LH přes syntetické membrány s předdefinovanými póry o velikosti $2\mu\text{m}$.



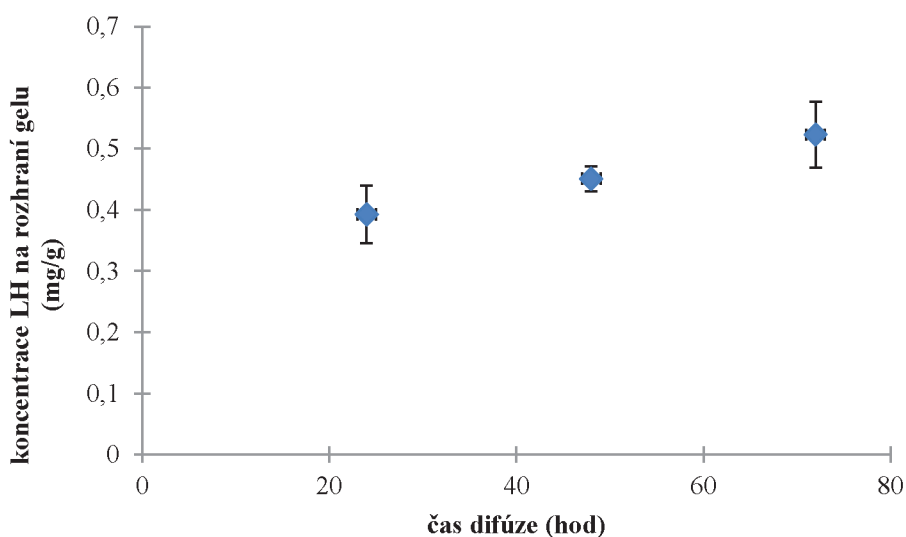
Obr. 72: Závislosti difúzního koeficientu na době difúze LH přes syntetické membrány s předdefinovanými póry o velikosti $10\mu\text{m}$.

Z hlediska porovnání stanovených efektivních difúzních koeficientů pro syntetické membrány je zřejmé, že jejich hodnoty jsou vyšší, než efektivní difúzní koeficienty stanovené z difúzních experimentů provedených na přírodních kutikulách. Tento jev ilustruje bariérové vlastnosti kutikul. Hodnoty z měření jsou souhrnně uvedeny v Tab. 9.

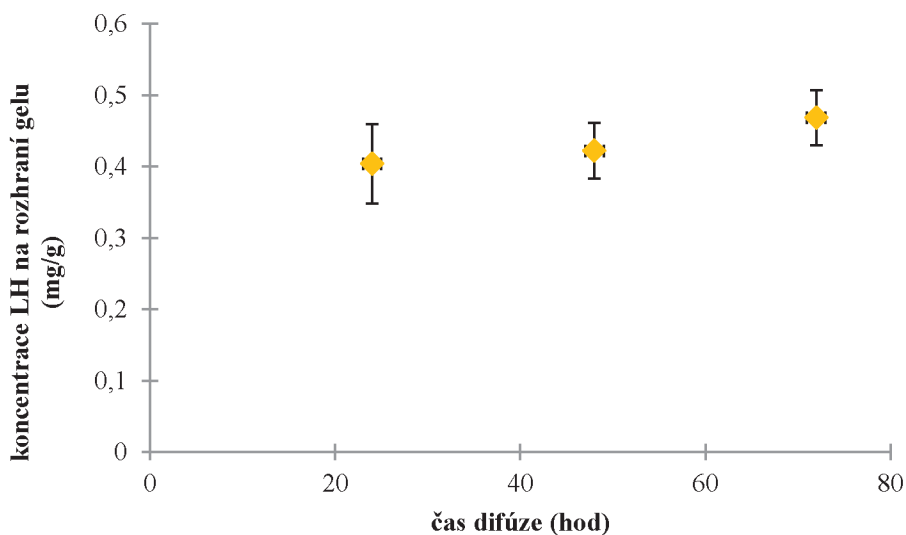
Tab. 9: Souhrn výsledků efektivních difúzních koeficientů D_{eff} a koncentrací na rozhraní kutikula/hydrogel c_0 pro syntetické membrány s velikostí pórů 2 respektive 10 μm .

Membrána	c_0 (mg/g)	D_{eff} ($\cdot 10^{10}$ m ² /s)
2 μm	0,455	1,642
10 μm	0,431	1,880

Grafy (Obr. 73 a Obr. 74) znázorňují závislost koncentrace na rozhraní (kutikula/hydrogel) na čase difúze.



Obr. 73: Závislost koncentrace LH na rozhraní hydrogel/kutikula na době difúze LH přes membránu s definovanými póry o velikosti 2 μm .



Obr. 74: Závislost koncentrace LH na rozhraní hydrogel/kutikula na době difúze LH přes membránu s definovanými póry o velikosti 10 μm .

7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium transportu kapalných lignohumátů přes rostlinné kutikuly, která měla simulovat aplikace foliárního hnojení a tedy výživu rostlin. Pokud má látka nějakým způsobem zasáhnout do struktury listu a vyvolat požadovaný fyziologický efekt, musí nejdříve překonat hlavní vrstvu rostliny – hydrolipidickou vrstvu na povrchu listu, zvanou kutikula. Ta se také stala předmětem našeho zkoumání a na základě literární rešerše byly tyto přírodní bariéry získávány optimalizovanou chemickou resp. enzymatickou metodou izolace. Transportní chování různých druhů kutikul izolovaných těmito metodami izolace byly následně mezi sebou porovnány na základě vizuálního hodnocení difúze a také na základě některých objektivních parametrů, stanovených objektivním vyhodnocením difúzních experimentů.

Pro tuto problematiku penetrace látek byly zvoleny vhodné teoretické difúzní modely (difúzní pár a volná difúze v polonekonečném prostředí), které byly optimalizovány a otestovány pro tento typ transportu látek. Experimenty difúzního páru jsou založeny na dvou hydrogelových médiích (přijímacím a zdrojovém) mezi něž byla uchycena rostlinná kutikula, druhý typ experimentu spočívá v upevnění listové bariéry na přijímací hydrogel, který byl následně ponořen do zásobního roztoku lignohumátu.

Na základě objektivního stanovení transportních parametrů – efektivní difúzní koeficienty – těchto difúzních experimentů bylo zjištěno, že spodní strany enzymaticky i chemicky izolovaných kutikul jsou schopny rychlejšího prostupu látek lignohumátu než v případě svrchních stran kutikul. Spodní kutikuly izolované chemickou metodou izolace jsou ale schopny rychlejšího prostupu než stejný druh kutikul izolovaný enzymatickou metodou, avšak v případě vrchních stran kutikul tomu bylo přesně naopak. Vzhledem k tomu, že stejný trend jsme pozorovali jak u modelů difúzního páru, tak modelu volné difúze, můžeme o těchto metodách hovořit jako o vhodných modelech pro studium transportu penetrace látek přes rostlinné kutikuly.

Pro vysvětlení pozorovaných odlišností v penetraci látek přes jednotlivé kutikuly byla využita optická a fluorescenční mikroskopie. Pomocí optické mikroskopie byly stanoveny odlišnosti ve strukturách abaxiálních a adaxiálních kutikul, kdy abaxiální bariéry obsahují kromě rostlinných pletiv také stomata, která jsou zodpovědná za rychlejší transport látek, kdežto svrchní strana listu je tvořena adaxiálními kutikulami, které se vyznačují jen pletivovou sítí. Mezi chemicky a enzymaticky izolovanými kutikulami nebyly na optickém mikroskopu pozorovány žádné výrazné změny, které by měly za následek odlišnost v bariérovém chování a v rychlosti penetrace látek.

Zajímavého poznatku bylo zjištěno při studiu degradace rostlinných kutikul vystavených působení destilované vody a vzduchu. Na základě experimentů bylo zjištěno, že enzymaticky izolované kutikuly nepodléhají degradaci na vzduchu ani po 14 dnech od izolace, avšak chemicky izolované kutikuly po této době začaly vykazovat určité rozdíly od doby izolace. Jejich struktura pletiv se začala postupně vytrácet a stomata začaly mít „rozkapénkovanou strukturu“. Při srovnání snímků z optického mikroskopu pořízených pro stejné druhy kutikul, akorát vystavené působení vodního roztoku, bylo zjištěno, že tyto bariéry rychleji podléhají degradaci, zejm. u chemicky izolovaných kutikul, než tomu bylo v případě vystavení na vzduchu.

Pro posouzení rozdílů v transportu látek přes chemicky a enzymaticky izolované kutikuly bylo využito fluorescenční mikroskopie, která umožnila stanovit doby života skupin přítomných v těchto kutikulách jako známku specifických fyzikálních a chemických změn, které ve struktuře kutikuly probíhají v rámci její degradace. Na základě této analýzy bylo zjištěno, že chemicky izolované kutikuly dosahují po izolaci menších hodnot dob života fluorescence, než je tomu v případě enzymaticky izolovaných kutikul. Následně byly pozorovány kutikuly po 11 dnech od izolace, kdy bylo zjištěno, že u chemicky izolovaných kutikul dochází k pohasínání fluorescence přítomných skupin, tudíž dochází ke snížení doby života fluorescence, což je nejspíš jeden z ovlivňujících faktorů transportních procesů látek. Vzhledem k tomu, že u enzymaticky izolovaných kutikul k takovému poklesu dob života fluorescence dochází mnohem pomaleji, můžeme o těchto strukturách říci, že transportují látky stejnou měrou po celou dobu difúze. V případě působení LH na rostlinné kutikuly bylo zjištěno, že enzymaticky izolované kutikuly nepodléhají ovlivnění z hlediska dob života fluorescence přítomných skupin, tedy transport lignohumátu by měl probíhat stejnou měrou. Naopak v případě difúze lignohumátu na chemicky izolované kutikuly již po době 1 dne, došlo k významnému poklesu dob života fluorescence, což bude opět známkou degradace a z ní plynoucího ovlivnění transportu látek.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] TAN, Kim Huat. *Humic matter in soil and the environment principles and controversies: genesis, composition, reactions*. New York. M. Dekker, 2003. ISBN 08-247-4862-X.
- [2] STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. New York. John Wiley a Sons, Inc. 1994. ISBN 04-715-9474-1.
- [3] GHABBOUR, E. A., KHAIRY, A. H., CHENEY, D. P., GROSS, V., DAVIES, G., GILBERT, T. R. a X. ZHANG. Isolation of humic acid from the brown alga *Pilayella littoralis*. *Journal of Applied Phycology*. 1994, r. 6, č. 5 – 6, s. 459 – 468. DOI:10.1007/BF02182399.
- [4] RADWAN, A., DAVIES, G., FATAFTAH, A., GHABBOUR, E. A., SUSAN A., JANSEN, R., WILLEY J. a X. ZHANG. Isolation of humic acid from the brown algae *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria saccharina* and the marine angiosperm *Zostera marina*. *Journal of Applied Phycology*. 1996, r. 8, č. 6, s. 459-468. DOI: 10.1007/BF02186335.
- [5] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. Praha. VŠCHT. 2009. ISBN 978-80-7080-701-9.
- [6] VESELÁ, L., KUBAL, M., KOZLER, J. a P. INNEMANOVÁ. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*. 2005, č. 99, s. 711 – 717.
- [7] SKOKANOVÁ, Marianna a Katarína DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Povod a štruktúra. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 262 – 268.
- [8] PENA-MÉNDEZ, E. M., HAVEL, J. a J. PATOČKA. Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*. 2005, r. 3, č. 1, s. 13 – 24.
- [9] SPRENGEL, Carl. *Die Bodenkunde oder die Lehre vom Boden, nebs einer vollständigen Anleitung Zur Chemischen analyse Der Ackererde...* Bavorská státní knihovna. Nabu Press. 2012. ISBN 9781275123205.
- [10] BERZELIUS, J. J. *Lehrbuch der Chemie: Erster Band*. Dresden a Leipzig. Der Arnoldischen Buchhandlung, 1843. ISBN 9780198558187.
- [11] SMILEK, Jiří. *Studium reaktivity biopolymerů v gelové fázi*. Brno. 2012. Diplomová práce. Vysoké učení technické, Fakulta chemická. Ústav fyzikální a spotřební chemie.
- [12] ODEN, Sven. *Die Huminsäuren*. Lipsko-Drážďany. 1919.
- [13] KLUČÁKOVÁ, Martina a Miloslav PEKAŘ. Behaviour of partially soluble humic acids in aqueous suspension. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008, r. 318, č. 1-3, s. 106-110. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.12.023..

- [14] SCHNITZER, M. a Shahamat U KHAN. *Humic substances in the environment*. New York. M. Dekker. 1994. ISBN 08-247-1614-0.
- [15] ACHARD, Franz Karl. *Chemische Annalen für die Freunde der Naturlehre...* Leipzig. I. Müller. 1784. ISBN 978-1-4020-6278-0.
- [16] GHABBOUR, Elham A. a Shahamat U KHAN. *Understanding Humic Substances: Advanced Methods, Properties and Applications*. Cambridge. Royal Society of Chemistry. 1972. ISBN 08-540-4799-9.
- [17] BURSÁKOVÁ, Petra. *Hydration of biomolecules*. Brno. 2009. Minimová práce. Vysoké učení technické, Fakulta chemická. Ústav fyzikální a spotřební chemie.
- [18] GHABBOUR, Elham A. a Goffrey DAVIES. *Humic Substances: Nature's Most Versatile Materials*. New York. Taylor and Francis, Inc. 2004. ISBN 0-203-59493-2.
- [19] KLÖCKING, Renate a B. HELBING. *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications: Humic Substances, Polyisoprenoids, Polyesters and Polysaccharides, Two Volumes*. Weinheim. Wiley-VCH. 2005. ISBN 35-273-1154-8.
- [20] SENESI, N., PROVENZANO, M. R. a G. BRUNETTI. Charakterization differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*. 1991, r. 152, č. 4, s. 259-271. DOI: 10.1097/00010694-199110000-00004.
- [21] SEDLÁČEK, Petr. *Hydrogely huminových kyselin – experimentální model i aplikační forma*. Brno. 2009. Dizertační práce. Vysoké učení technické, Fakulta chemická. Ústav fyzikální a spotřební chemie.
- [22] ERNY, G. L., GONÇALVES M. B. a V. I. ESTEVES. Immobilized humic substances and immobilized aggregates of humic substances as sorbent for solid phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 2013, r. 1306, č. 4, s. 104 – 108. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.07.057.
- [23] KALINA, M., KLUČÁKOVÁ, M. a P. SEDLÁČEK. Utilization of fractional extraction for characterization of the interactions between humic acids and metals. *Geoderma*. 2013, r. 207-208, č. 4, s. 92 – 98. DOI: 10.1016/j.geoderma.2013.04.031.
- [24] KLUČÁKOVÁ, M., KALINA, M., SEDLÁČEK, P. a L. GRASSET. Reactivity and transport mapping of Cu(II) ions in humic hydrogels. *Journal of Soils and Sediments*. 2014, r. 14, č 2, s. 368-376. DOI: 10.1007/s11368-013-0730-2.
- [25] Theil, K. D., Klöcking R. a B. Helbig. *Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt Orig A*. 1976, 234: 159-169.
- [26] KLÖCKING, R., SPRÖSSIG, M., WUTZLER, P., THIEL K. D. a B. HELBIG. Antiviral wirksame Huminsäuren und huminsäureähnliche Polymere. *Physikalische Medizin*,

- Rehabilitationsmedizin, Kurortmedizin*. 1983, r. 35, č. 2, s. 95-101. DOI: 10.1055/s-2008-1065760.
- [27] PROJEKT. *Nové metody a postupy při sklizni a zpracování obilovin*. 10/010/1310b/110/002595. Evropský zemědělský fond pro rozvoj venkova: Evropa investuje do venkovských oblastí.
- [28] REUVENI, R. a M. REUVENI. Foliar-fertilizer therapy – a concept in integrated pest management. *Crop Protection*. 1998, r. 17, č. 2, s. 111 – 118. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0261-2194\(97\)00108-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0261-2194(97)00108-7).
- [29] ELDER, Kay a Brian DALE. *In-vitro fertilization*. New York. Cambridge University Press. 2011. ISBN 9780521730723.
- [30] Výroba a využití organických hnojiv – organické látky. Mendelova univerzita v Brně. [online]. 20-03-2013 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=470
- [31] COMTE, I., COLIN, F., GRÜNBERGER, O., FOLLAIN, S., WHALEN J. K. a J. P. 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
- [32] 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.
- [33] NEUMANN, Peter M. a M. REUVENI. Rapid Evaluation of Foliar Fertilizer-induced Damage: N, P, K, S on Corn1. *Agronomy Journal*. 1979, r. 71, č. 4, s. 598. DOI: 10.2134/agronj1979.00021962007100040019x.
- [34] LI, Dejun a Xinming 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.
- [35] MCCLANAHAN, T. R., CARREIRO-SILVA M. a M. DILORENZO. Effect of nitrogen, phosphorous, and their interaction on coral reef algal succession in Glover's Reef, Belize. *Marine Pollution Bulletin*. 2007, r. 54, č. 12, s. 1947 – 1957. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2007.09.023.
- [36] SANTOS, J. I., DA SILVA, T. R. B., ROGÉRIO, F., SANTOS R. F. a Deonir 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.

- [37] LIU, Chien-Hung, Jane-Yii WU a Jo-Shu CHANG. Diffusion characteristics and controlled release of bacterial fertilizers from modified calcium alginate capsules. *Bioresource Technology*. 2008, vol. 99, issue 6, s. 1904-1910. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.03.029.
- [38] SANTOS, J. I., DA SILVA, T. R. B., ROGÉRIO, F., SANTOS R. F. a Deonir 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.
- [39] SUN, N., ZENG X., LI, J., GAO J. a B. WANG. Effects of Magnesium Compound with Fertilizer on Daylily (*Hemerocallis citrina* Baroni) Growth and Soil Nutrients. *Agricultural Sciences in China*. 2006, r. 5, č. 2, s. 123-129. DOI: 10.1016/S1671-2927(06)60029-1.
- [40] 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.
- [41] HAAS, K., J. SCHÖNHERR, M. RIEDERER, Uta GEYER a J. SCHÖNHERR. Composition of soluble cuticular lipids and water permeability of cuticular membranes from citrus leaves: Accomplishments and prospects. *Planta*. 1979, vol. 146, issue 4, s. 603 – 606. DOI: 10.1007/978-1-4684-1303-8_137.
- [42] BUCHHOLZ, A., SCHÖNHERR, J., RIEDERER, M., GEYER U. a J. SCHÖNHERR. Characterization of the diffusion of non-electrolytes across plant cuticles: Accomplishments and prospects. *Journal of Experimental Botany*. 2006-07-07, r. 57, č. 11, s. 2501 – 2513. DOI: 10.1093/jxb/erl023.
- [43] SCHÖNHERR, Jörg. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany*. 2006, r. 57, č. 11, s. 2471-2491. DOI: 10.1093/jxb/erj217.
- [44] Obecná botanika. Anatomie listu. Mendelova univerzita v Brně. [online]. 28-04-2008 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/texty-organologie-anatomie.html
- [45] Předmětová komise biologie a chemie. Anatomie a morfologie rostlin. Gymnázium Ivana Olbrachta Semily. [online]. 2013 [cit. 2014-04-27] Dostupné z: <http://giobio.ic.cz/studijni-materialy/biologie-obrazky/botanika/anatomie-a-morfologie-rostlin.html>.
- [46] VOTRUBOVÁ, Olga. *Anatomie rostlin*. Praha. Karolinum. 2001. ISBN 80-246-0367-5
- [47] MOLINA, Isabel. Biosynthesis of plant lipid polyesters. *Plant Lipid Biochemistry* [online]. 26-06-2010 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/polyesters/index.htm>
- [48] TAIZ, Lincoln a Eduardo ZEIGER. *Plant physiology*. Sunderland. MA: Sinauer Associates. 2010. ISBN 9780878938667.
- [49] RENN, Donald W. Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *Industrial*. 1984, r. 23, č. 1, s. 17-21. DOI: 10.1021/i300013a004.

- [50] TRIVEDI, T. J., SRIVASTAVA D. N., ROGERS, R. D. a KUMAR, A. Agarose processing in protic and mixed protic–aprotic ionic liquids: dissolution, regeneration and high conductivity, high strength ionogels. *Green Chemistry*. 2012, r. 14, č 10, s. 259 – 271. DOI: 10.1039/c2gc35906e.
- [51] SAMBROOK, Joseph a David W RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York. Cold spring harbor laboratory press. 2001. ISBN 978-0-87969577-4.
- [52] MORRIS, E., NISHINARI, R. a M. RINAUDO. Gelation of gellan – A review. *Food Hydrocolloids*. 2012, r. 28, č. 2, s. 373 – 411. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.01.004
- [53] FUJII, T., YANO, T., KUMAGAI, H. a T. MIYAWAKI. Scaling Analysis of the Concentration Dependence on Elasticity of Agarose Gel. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2000, r. 64, č. 8, s. 1618-1622. DOI: 10.1271/bbb.64.1618.
- [54] MATSUO, M., TANAKA, T. a Li MA. Gelation mechanism of agarose and κ -carrageenan solutions estimated in terms of concentration fluctuation. *Polymer*. 2002, r. 43, č. 19, s. 5299 – 5309. DOI: 10.1016/S0032-3861(02)00290-2.
- [55] HA, Y. a C. BARTER. Rapid separation of plazma lipoproteins by gel permeation chromatography on agarose gel Superose 6B. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1985, r. 341, č. 12, s. 154 – 159. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)84020-7.
- [56] CHUNG, J. A., WOLLACK, J. W., HOVLID, M., OKESLI, L., 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, r. 386, č. 1, s. 1 – 8. DOI: 10.1016/j.ab.2008.09.007.
- [57] 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, r. 7, č. 2. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.07.032.
- [58] BHAT S. a Ashok KUMAR. Cell proliferation on three-dimensional chitosan–agarose–gelatin cryogel scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012, r. 114, č. 6, s. 663 – 670. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.07.005.
- [59] GAO, M., LU, P., BEDNARK, B., LYNAM, D., CONNER, J. M., SAKAMOTO, J. Compression behaviour of biphasic calcium phosphate and biphasic calcium phosphate–agarose scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*. 2013, r. 34, č 5, s. 1529-1536. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.070.
- [60] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Praha. VŠCHT. 2002. ISBN 80-708-0475-0.

- [61] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha. VŠCHT. 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [62] MASARO, L, ZHU, X. X. Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Progress in Polymer Science*. 1999, r. 24, č. 5, s. 731 – 775. DOI: 10.1016/S0079-6700(99)00016-7.
- [63] CRANK, John a Jaroslav LONGAUER. *The mathematics of diffusion: difúzne procesy, prestup látky, absorpcia, adsorpcia, destilácia a rektifikácia, extrakcia, úprava vzduchu a chladenie vody, sušenie, kryštalizácia, membránové procesy*. Oxford. Oxford University Press, 2000, ISBN 978-0-19-853411-2.
- [64] CUSSLER, E. *Diffusion: mass transfer in fluid systems*. New York. Cambridge University Press. 2009. ISBN 978-0-521-87121-1.
- [65] ORGELL, W. H. The Isolation of Plant Cuticle with Pectic Enzymes. *Plant Physiology*. 1955, r. 30, č. 1. DOI: 10.1104/pp.30.1.78.
- [66] SCHREIBER, Lukas a Jörg SCHÖNHERR. *Water and solute permeability of plant cuticles: measurement and data analysis*. Springer, 2009. ISBN 35-406-8945-1.
- [67] EDGINGTON, L., BUCHENAUER H., GROSSMANN F. a J. SCHÖNHERR. Bioassay and transcuticular movement of systemic fungicides. *Pesticide Science*. 1973, r. 4, č. 5, IV-1-752. DOI: 10.1016/b978-0-08-023930-9.50166.
- [68] SOLEL, Z a Lloyd EDGINGTON. Transcuticular Movement of Fungicides. *Phytopathology*. 1972, r.. 63, č. 4. DOI: 10.1094/phyto-63-505.
- [69] SOLEL, Z., BUCHENAUER, H., GROSSMANN F. a J. SCHÖNHERR. Transcuticular Movement of Fungicides. *Phytopathology*. 1973, r.. 63, č. 4, IV-1-752. DOI: 10.1094/phyto-63-505.
- [70] SANTIER, S., CHAMEL, A., GROSSMANN, F. a J. SCHÖNHERR. Reassessment of the role of cuticular waxes in the transfer of organic molecules through plant cuticles. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1998, r. 36, č. 3, IV-1-752. DOI: 10.1016/s0981-9428(97)86879-9.
- [71] ZELENÁ, V., VEVERKA, K. Effect of Surfactants and Liquid Fertilisers on Transcuticular Penetration of Fungicides. *Plant Protect. Sci*. 2007, r. 43, č. 4. DOI: 10.1021/la00029a041.
- [72] 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.

- [73] 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.
- [74] LAŠTŮVKOVÁ, Marcela. *Návrh a optimalizace metody studia penetrace huminových kyselin do listů*. Brno. 2012. Vysoké učení technické, Fakulta chemická. Ústav fyzikální a spotřební chemie.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

9.1 Použité zkratky

<i>Zkratky</i>	<i>význam zkratek</i>
DP	díplomová práce
HL	humínové látky
SOM	půdní organická hmota
HK	humínové kyseliny
FK	fulvínové kyseliny
HU	huminy
PFZ	první Fickův zákon
DFZ	druhý Fickův zákon
MIP	rtuťová porozimetrie
SEM	skenovací elektronový mikroskop
MT	micelární templátování
EMI	enzymatická metoda izolace
CHMI	chemická metoda izolace
FCS	fluorescenční mikroskop
CHIK	chemicky izolované kutikuly
EIK	enzymaticky izolované kutikuly
LVO	vysoko viskozitní agaróza
AG	agaróza
LH	lignohumát
ZH	zdrojový hydrogel
PH	přijímací hydrogel
PVA	polyvinylalkohol
CTAB	cetyltriamonium bromid

9.2 Použité symboly

<i>symbol</i>	<i>význam</i>	<i>jednotka</i>
j_1	jednosměrný difúzní tok	$[\text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}]$
A	plocha	$[\text{m}^2]$
c	molární koncentrace	$[\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}]$
x	prostorová souřadnice, vzdálenost	$[\text{m}]$
D	difúzní koeficient	$[\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}]$
D_{eff}	efektivní difúzní koeficient	$[\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}]$
t	čas difúze	$[\text{s}]$
G'	elastický modul	$[\text{Pa}]$
G''	viskózní modul	$[\text{Pa}]$
$c_{1\infty}$	původní koncentrace	$[\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}]$
c_{10}	rozdíl koncentrace (začátek/konec)	$[\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}]$
n_1	látkové množství difundující látky	$[\text{mol}]$
c_0	počáteční koncentrace	$[\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}]$

10 SEZNAM PUBLIKACÍ

LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J. Využití difúzních technik pro studium transportu lignohumátů přes rostlinné kutikuly. *Studentská konference Chemie je život Sborník příspěvků*. Brno, FCH VUT. 2013. s. 109-114. ISBN 978-80-214-4823-0.

LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; PEKAŘ, M. *Penetration of dissolved humic fertilizers to leaves studied by simple diffusion technique*. European Colloid and Interface Society (ECIS) 2013 Abstracts – Complex Fluids and Environmental Colloid Science. Sofia, Bulgaria. 2013. p. 1-1.

LAŠTŮVKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; SMILEK, J. Návrh a testování metody studia transportu kapalných humátů skrz rostlinné kutikuly. *Studentská konference Chemie je život Sborník příspěvků*. Brno, FCH VUT. 2012. s. 168-174. ISBN 978-80-214-4425-6.

SEDLÁČEK, P.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; KLUČÁKOVÁ, M.; PEKAŘ, M.; SMILEK, J. *Simple technique for modelling transcuticular transport of liquid humic in leaves*. Humic Innovations Technologies (HiT) 2012 Abstracts. Moscow, Lomonosov MSU. 2012. p. 48-48.

11 SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1	FCS mikroskop MicroTime 200 (Pico Quant)
PŘÍLOHA 2	Rheometr AR-G5 (TA Instruments Inc.)
PŘÍLOHA 3	UV-VIS spektrofotometr Varian (Cary 50)
PŘÍLOHA 4	Posuvný nástavec pro měření UV-VIS spekter
PŘÍLOHA 5	Porovnání mikroskopických snímků po 5 dnech od izolace chemicky izolované kutikuly (vzduch vs. vodný roztok)
PŘÍLOHA 6	Porovnání mikroskopických snímků po 10 dnech od izolace chemicky izolované kutikuly (vzduch vs. vodný roztok)
PŘÍLOHA 7	Studium rostlinných kutikul pod fluorescenčním mikroskopem: chemicky izolované kutikuly – spodní (vlevo), svrchní (vpravo) enzymaticky izolované kutikuly – spodní (vlevo), svrchní (vpravo)
PŘÍLOHA 8	Srovnání difúzí HK přes EIK, abaxiální strana 1, 2 a 3 dny
PŘÍLOHA 9	Srovnání difúzí HK přes CHIK, abaxiální strana 1, 2 a 3 dny
PŘÍLOHA 10	Výsledky profilů kutikul izolovaných EMI a CHMI
PŘÍLOHA 11	Profilometrie chemicky izolovaných kutikul (spodní, svrchní)
PŘÍLOHA 12	Porovnání difúzních experimentů EIK a CHIK (spodní, svrchní)

PŘÍLOHA 1



PŘÍLOHA 2



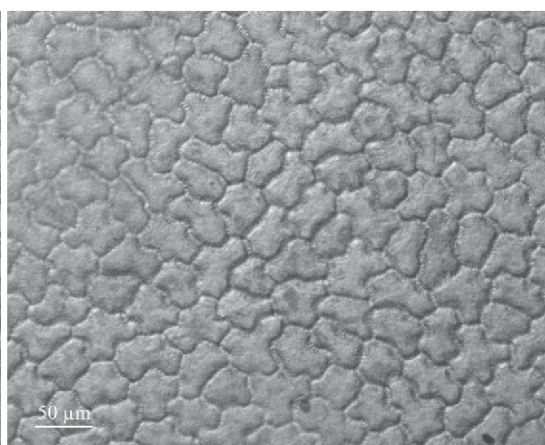
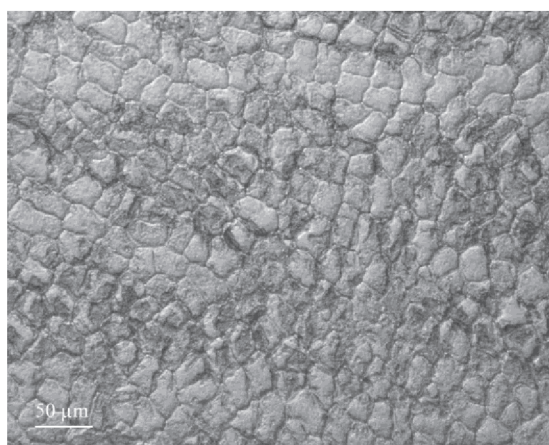
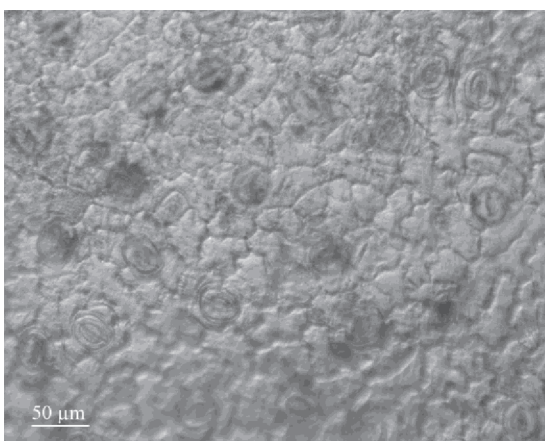
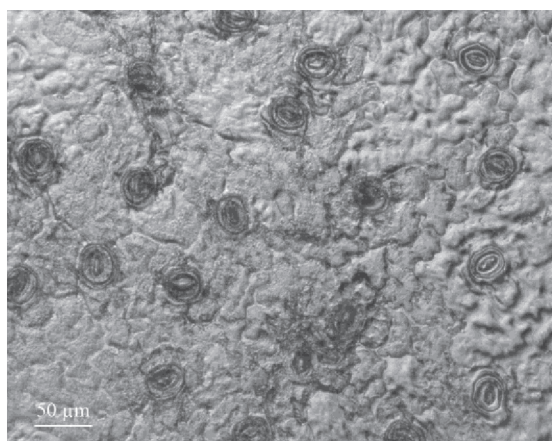
PŘÍLOHA 3



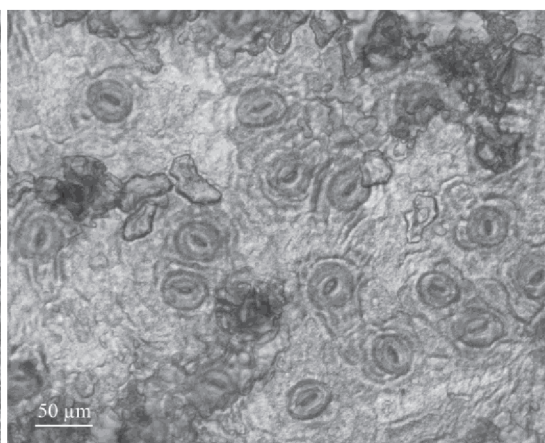
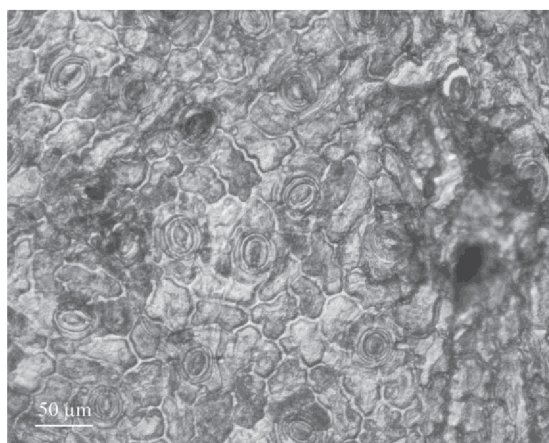
PŘÍLOHA 4



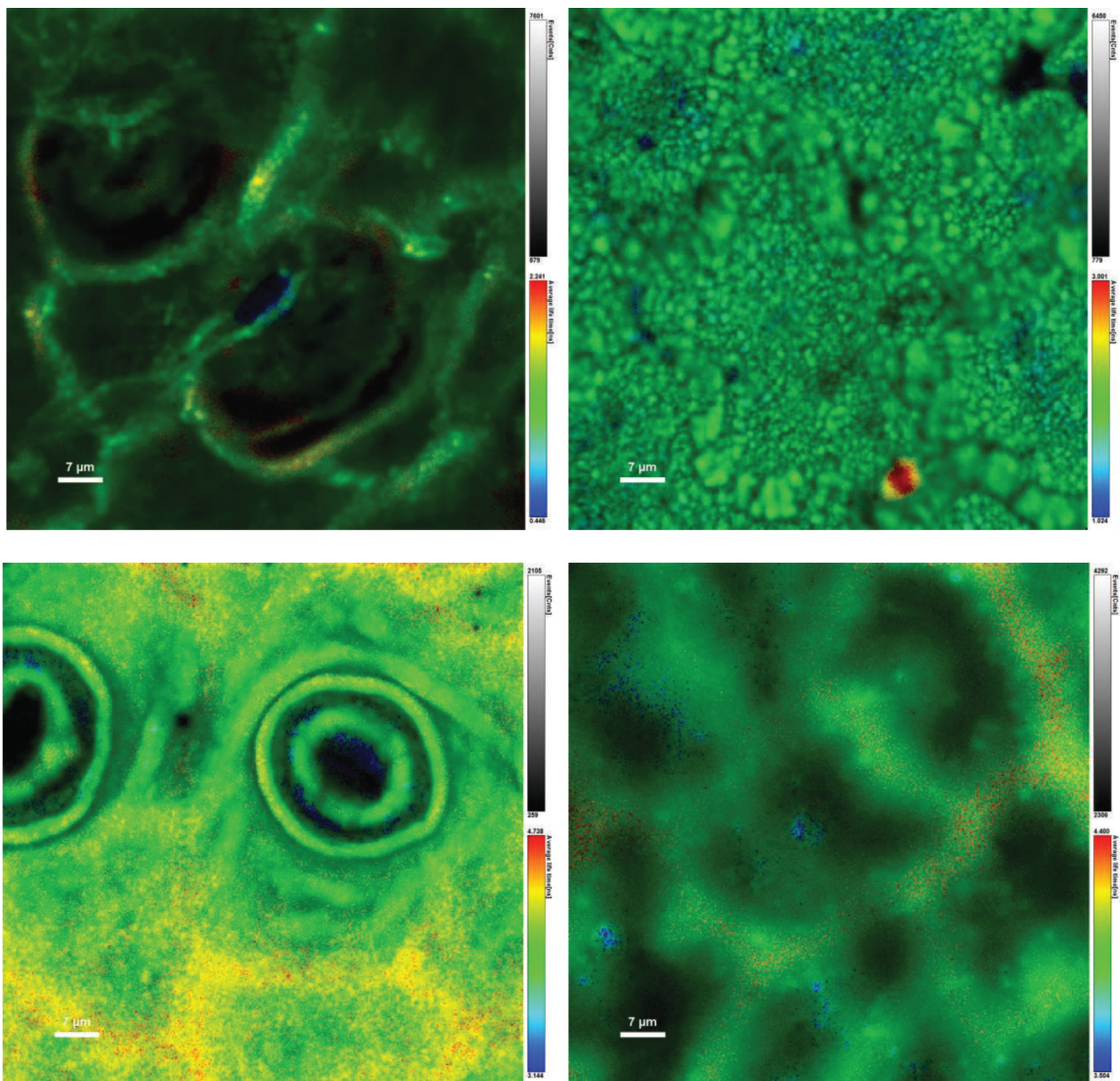
PŘÍLOHA 5



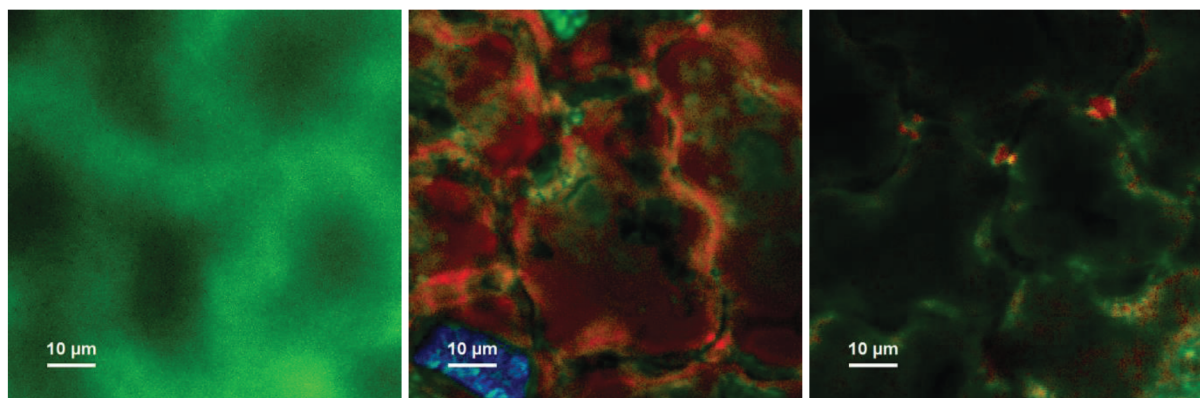
PŘÍLOHA 6



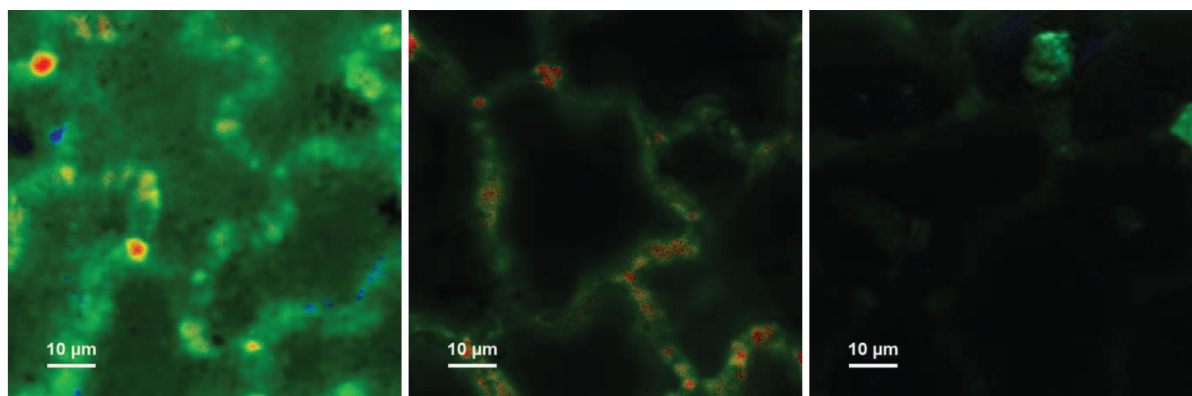
PŘÍLOHA 7



PŘÍLOHA 8



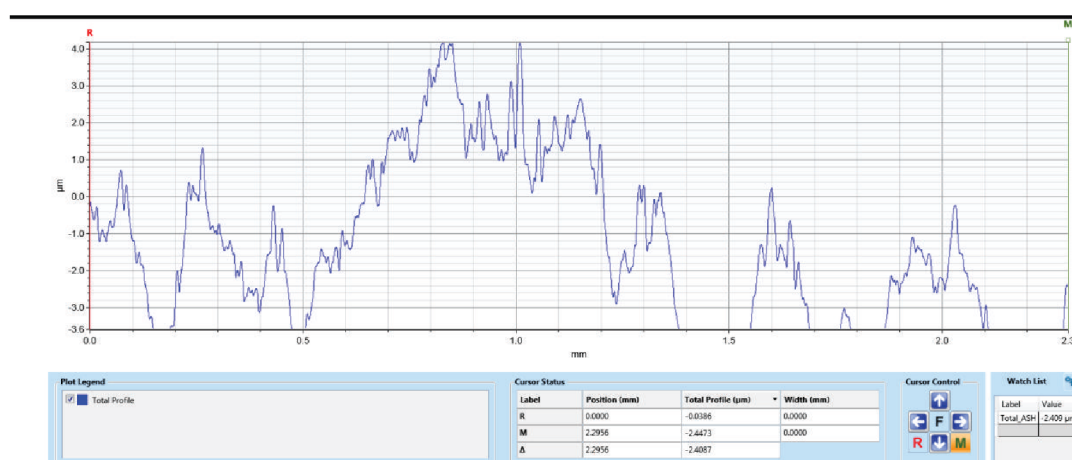
PŘÍLOHA 9

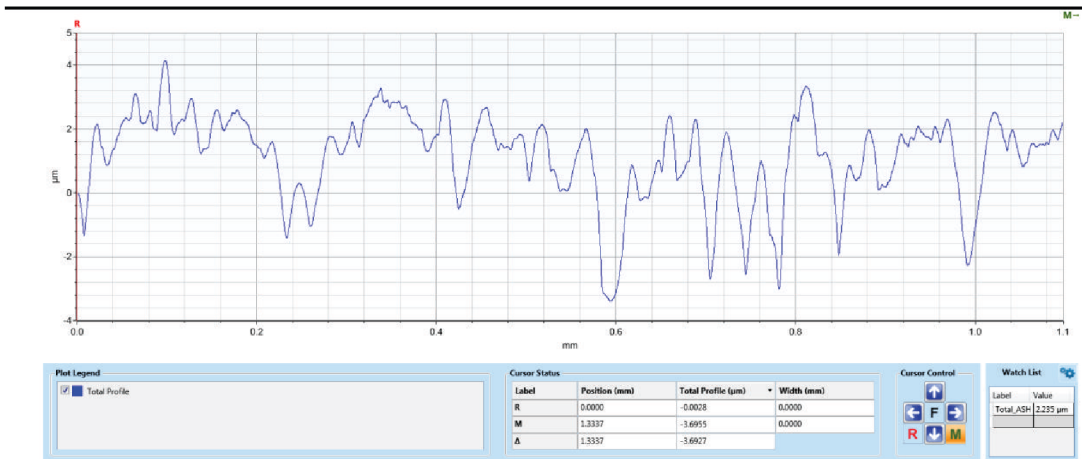


PŘÍLOHA 10

E spodní	tloušťka (μm)			průměr (μm)
vzorek 1	2,780	3,230	–	3,005
vzorek 2	3,100	3,105	2,936	3,047
vzorek 3	2,645	2,482	2,595	2,574
E_svrchní	tloušťka (μm)			průměr (μm)
vzorek 1	2,930	4,650	5,01	4,197
vzorek 2	3,519	3,703	3,198	3,473
vzorek 3	3,159	2,247	–	2,703
CH spodní	tloušťka (μm)			průměr (μm)
vzorek 1	–	–	–	–
vzorek 2	3,751	3,473	4,459	3,894
vzorek 3	5,19	4,493	2,615	4,099
CH_svrchní	tloušťka (μm)			průměr (μm)
vzorek 1	3,481	3,611	1,985	3,026
vzorek 2	3,646	3,800	1,887	3,111
vzorek 3	3,626	1,811	1,769	2,402

PŘÍLOHA 11





PŘÍLOHA 12

