



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# STUDIUM VLIVU APLIKACE PLAZMATEM AKTIVOVANÉ VODY NA ENZYMATICKOU AKTIVITU PŮD

STUDY OF PLASMA ACTIVATED WATER APPLICATION ON THE SOIL ENZYME ACTIVITY

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tereza Lungová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. František Krčma, Ph.D.

BRNO 2023

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1846/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Tereza Lungová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. František Krčma, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Studium vlivu aplikace plazmatem aktivované vody na enzymatickou aktivitu půd

### Zadání diplomové práce:

1. Na základě literárních rešerší zvolte optimální metodu pro vyhodnocení enzymatické aktivity v půdě.
2. Navrhněte experiment za využití nádobových pokusů s vybranou modelovou rostlinou.
3. Charakterizujte vliv plazmatem aktivované vody na enzymatickou aktivitu v půdě v souvislosti s obsahem tzv. long live species – dusitany, dusičnany a peroxid vodíku.

### Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

-----  
Bc. Tereza Lungová  
studentka

-----  
prof. RNDr. František Krčma,  
Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## ABSTRAKT

Cílem diplomové práce byla charakterizace plazmatem aktivované vody (PAW) připravené pomocí dielektrického bariérového výboje za atmosférického tlaku a vyhodnocení jejího vlivu na půdní enzymatickou aktivitu ve vzorku černoze s obsahem chemicky aktivních látek s dlouhou dobou života, tzv. *long life species*. K tomuto účelu byla na základě literárních rešerší zvolena metoda tzv. nádobových pokusů. Ke zjištění celkové půdní mikrobiální aktivity byla stanovena aktivita enzymu dehydrogenázy (DHA) ve vzorcích půdy zalévaných plazmatem aktivovanou vodou s různou dobou aktivace. Enzym dehydrogenáza je řazen do skupiny oxidoreduktáz a jeho aktivita je vhodným ukazatelem pro stanovení aktivní biologické činnosti v půdě. V této práci byly stanoveny hodnoty aktivity dehydrogenázy pro PAW ošetřenou výbojem po dobu 2 minut  $2,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , pro PAW ošetřenou výbojem po dobu 5 minut  $2,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  a pro PAW ošetřenou po dobu 10 minut  $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Ve srovnávacím vzorku zalévaném destilovanou vodou byla hodnota dehydrogenázové aktivity stanovena  $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Na základě celkové analýzy bylo zjištěno, že nedochází k negativnímu ovlivňování enzymatické aktivity v půdě navzdory široké škále potvrzení o antimikrobiálních účincích PAW.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Půdní organická hmota, plazma, plazmatem aktivovaná voda, chemicky aktivní látky, dehydrogenázová aktivita

## **ABSTRACT**

The aim of this thesis was the characterization of plasma activated water (PAW) prepared by dielectric barrier discharge under atmospheric pressure and the evaluation of its effect on soil enzymatic activity in a black soil sample, which contains chemically active substances so-called long life species. For this purpose, the pot experiment was chosen based on literature research. Dehydrogenase (DHA) enzyme activity was investigated to determine total soil microbial activity in soil samples watered with plasma activated water with different activation times. Dehydrogenase belongs to the group of oxidoreductases and its activity is a suitable indicator of active biological activity in the soil. In this work, the values of dehydrogenase activity were determined for PAW with 2 minute treatment  $2,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , for PAW with 5 minutes treatment  $2,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  and for PAW treated with plasma discharge for 10 minutes  $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . In the comparative sample, which was watered with distilled water, the value of dehydrogenase activity was determined to be  $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Based on the overall analysis, it was found that there is no negative influence on the enzymatic activity in the soil despite the wide range of confirmation of the antimicrobial effects of PAW.

## **KEYWORDS**

Soil organic matter, plasma, plasma activated water, reactive species, dehydrogenase activity

LUNGOVÁ, Tereza. *Studium vlivu aplikace plazmatem aktivované vody na enzymatickou aktivitu půd*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/146221>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce František Krčma.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....

Podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

V první řadě bych ráda poděkovala svému vedoucímu prof. RNDr. Františkovi Krčmovi, PhD. za odborné vedení. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Kateřině Liškové za užitečné rady, tipy na zdroje, trpělivost, a hlavně za celkový zájem o kvalitu mé práce.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>8</b>
2.1	Půda.....	8
2.1.1	Funkce půdy.....	9
2.1.2	Složení půdy .....	10
2.2	Půdní organická hmota.....	12
2.2.1	Mineralizace.....	12
2.2.2	Ulmifikace a karbonizace .....	13
2.2.3	Humifikace .....	13
2.3	Půdní mikroorganismy .....	15
2.3.1	Role v půdě a význam pro rostlinu .....	15
2.3.2	Degradace půdy.....	16
2.3.3	Rhizobium spp. ....	16
2.3.4	Azotobacter spp.....	17
2.4	Fixace a koloběh dusíku v půdě .....	17
2.5	Půdní enzymy .....	19
2.5.1	Role a význam.....	20
2.5.2	Dehydrogenáza .....	20
2.6	Plazma.....	21
2.6.1	Klasifikace plazmatu .....	21
2.6.2	Vlastnosti plazmatu .....	22
2.6.3	Typy plazmových výbojů .....	23
2.7	Elektrické výboje v kontaktu s kapalinami .....	26
2.7.1	Plynné plazma s tekutou elektrodou.....	26
2.7.2	Přímé elektrické výboje generované v kapalinách.....	26
2.8	Plazmatem aktivovaná voda (PAW).....	27
2.9	Charakterizace PAW .....	28
2.9.1	Stanovení pH.....	28
2.9.2	Stanovení měrné vodivosti .....	29
2.9.3	Stanovení redoxního potenciálu.....	29
2.9.4	Stanovení peroxidu vodíku.....	29

2.9.5 Stanovení dusičnanů a dusitanů .....	30
<b>3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>31</b>
3.1 Působení plazmatem aktivované vody na bakterie .....	31
3.2 Aplikace PAW v zemědělství.....	33
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>37</b>
4.1 Použité chemikálie.....	37
4.2 Použité přístroje.....	37
4.3 Příprava nádobového pokusu .....	38
4.4 Příprava PAW.....	39
4.5 Fyzikální a chemická charakterizace PAW .....	40
4.5.1 Spektrofotometrické stanovení dusitanů .....	40
4.5.2 Spektrofotometrické stanovení dusičnanů.....	41
4.5.3 Spektrofotometrické stanovení peroxidu vodíku .....	42
4.6 Stanovení půdní enzymatické aktivity .....	43
4.6.1 Spektrofotometrické stanovení 1,3,5-Triphenyltetrazolium formazanu (TPF) 43	
4.7 Stanovení počtu dusík poutajících mikroorganismů v půdě .....	45
4.7.1 Příprava kultivačního média .....	45
4.7.2 Příprava suspenzí .....	46
4.7.3 Ředění a očkování suspenzí .....	46
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>47</b>
5.1 Charakterizace PAW .....	47
5.2 Stanovení dehydrogenázové aktivity .....	51
5.3 Stanovení vlivu PAW na dusík fixující bakterie .....	53
<b>6 ZÁVĚR.....</b>	<b>58</b>
<b>7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>60</b>
<b>8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>66</b>
<b>9 SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>67</b>
<b>10 SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>68</b>

# 1 ÚVOD

Předmětem této práce je studium vlivu plazmatem aktivované vody na enzymatickou aktivitu v půdě v souvislosti s obsahem chemicky aktivních látek s dlouhou dobou života, tzv. *long life species*. V poslední době se plazmatem aktivovaná voda (z anglického *Plasma activated water*, PAW) stává stále častějším tématem výzkumu v zemědělství, především díky svým jedinečným vlastnostem. Hlavní výhodou použití PAW v zemědělství je především její šetrnost k životnímu prostředí. Ukazuje se jako účinný prostředek k hubení patogenních mikroorganismů, jako jsou plísně a bakterie, což může vést k omezení používání pesticidů. Dalšími výhodami jsou také jednoduché zavedení do provozu, finančně nenáročná příprava a jednoduchá aplikace. Dosud ale nebyl dostatečně prozkoumán vliv PAW na enzymatickou aktivitu v půdě.

Enzymatická aktivita je důležitým ukazatelem biologické aktivity půdy, jelikož enzymy jsou klíčovými katalyzátory řady půdních procesů a taktéž se podílejí na rozkladu organické hmoty. Vyšší enzymatická aktivita by mohla vést k lepšímu využití živin v půdě a podpoře růstu semen, rostlin a plodin. Hlavním zájmem této práce je tedy prozkoumat, zda v půdě po ošetření PAW nedochází k případným nežádoucím vlivům na kvalitu půdy.

Použití nádobových pokusů se jeví jako vhodná metoda k určení obsahu chemicky aktivních látek v půdě po aplikaci PAW a taktéž ke stanovení vlivu této vody na půdní enzymatickou aktivitu. Tato metoda spočívá v umístění vzorků půdy do nádob při daných laboratorních podmínkách a součástí je pravidelné zalévání vzorků půdy PAW a srovnání s kontrolními vzorky zalévanými vodou destilovanou. Po určité době dojde ke stanovení obsahu chemicky aktivních látek a aktivit enzymů vzniklých v průběhu této inkubace v půdních vzorcích pomocí různých analytických metod, jako je např. spektrofotometrie. Výhodou nádobových experimentů je, že jsou relativně jednoduché a rychlé, což umožňuje snadnou analýzu velkého množství vzorků.

Výsledky této práce by mohly přispět k dalšímu výzkumu použití plazmatem aktivované vody v zemědělství a dalších oblastech a ukázat její potenciál pro šetrné ošetření půdy.



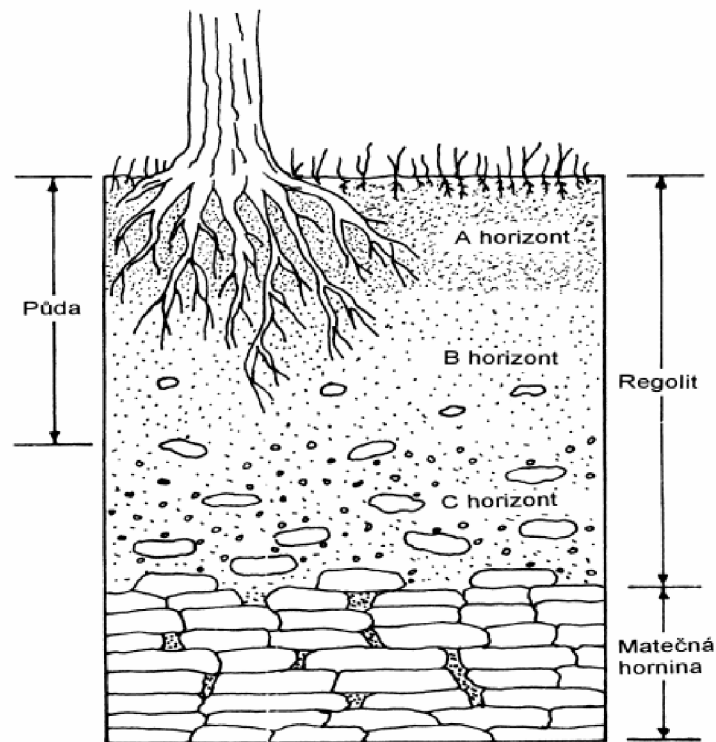
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Půda

Půda tvoří nepostradatelnou složku životního prostředí s širokým rozsahem funkcí. Vzhledem k její složitosti a komplexnosti ji lze definovat mnoha způsoby. Obecně se jedná o dynamický útvar, který vzniká a neustále se vyvíjí v důsledku zvětrávání hornin a minerálů zemské kůry a degradaci zbytků organismů za působení půdotvorných faktorů a současně je schopný zajišťovat vhodné životní podmínky pro organismy v něm žijící [1,2].

Vznik a vývoj půdy je dlouhodobý proces, který je ovlivňován půdotvornými činiteli. Tito činitelé jsou děleni na dvě základních skupiny, a to na půdotvorné faktory a podmínky půdotvorného procesu. Půdotvorné faktory mají přímý vliv na vznik půdy s určitými vlastnostmi, které se však s dalším vývojem půdy postupně mění. Mezi tyto faktory se řadí matečná hornina, klima, vliv organismů, podzemní voda a antropogenní vlivy. Naopak podmínky půdotvorného procesu do pedogenetického procesu přímo nevstupují, ale ovlivňují charakter půdotvorných faktorů. Za podmínky půdotvorného procesu považujeme georeliéf a čas [3,4].

Schéma půdního profilu je viditelné na Obrázku 1. Podkladový skalní masiv je tvořen matečnou horninou. Jedná se nejčastěji o vyvřelou horninu, která dává vzniknout půdě. Zvětráváním tohoto skalního podkladu nebo nánosem materiálu přineseného odjinud větrem, vodou, ledovcem apod. vzniká další půdní vrstva nazývaná regolit. Tato vrstva může mít tloušťku několik milimetrů až několik desítek metrů a je členěna do několika horizontů. Povrchový horizont A je složený z rozloženého, amorfního organického materiálu, který je promíchán s minerálními částicemi. Z tohoto horizontu bývají organické látky vymývány do spodních vrstev, které tvoří minerální horizont B. Tento horizont je chudší na organickou hmotu a také je charakteristický světlejším zbarvením. K již zmíněnému vymývání organické hmoty a kationtů dochází skrz eluviální horizont E, který tvoří v podzolech přechod mezi horizontem A a B. Matečná hornina je pokryta horizontem C, který je nejspodnějším horizontem regolitu. Má skeletovitý charakter a je tvořen částečně zvětralou horninou [1].



Obrázek 1: Schématický profil minerální půdy [1]

### 2.1.1 Funkce půdy

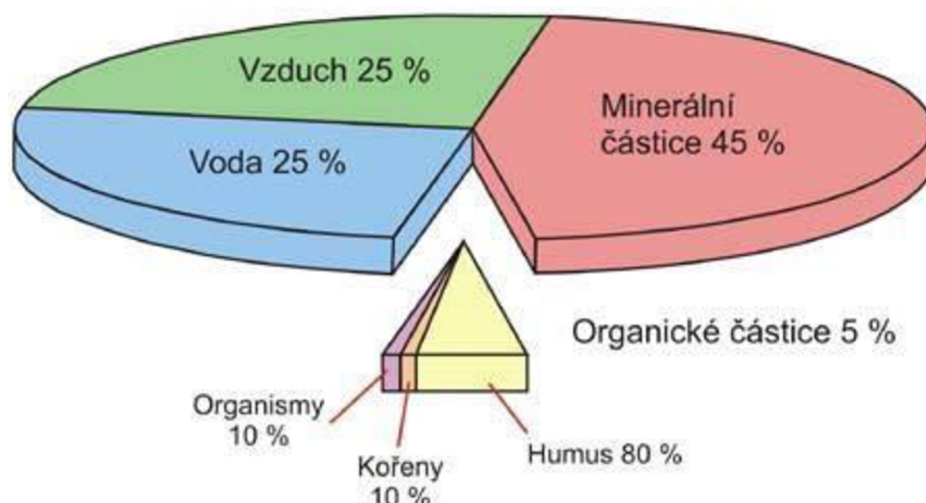
Jak již bylo zmíněno výše, půda vykonává celou řadu funkcí. Tyto funkce je možné rozdělit celkem do třech základních kategorií, a to na produkční, mimoprodukční a kulturní. Rozdělení půd podle funkce do jednotlivých kategorií je ale pouze informativní, jelikož v reálném prostředí dochází k vzájemnému prolínání jednotlivých funkcí. Všechny půdní funkce jsou tak v úzkých vzájemných vztazích a jsou navzájem zranitelné při různých formách degradace půdy [5,6].

Produkční funkce jsou spojeny s poskytováním výnosu. Půda je zde chápána jako využitelný zdroj, který vytváří životní prostředí pro růst hospodářských plodin, vytváří plochu pro hospodářské a stavební využití a je zdrojem neobnovitelných surovin (písky, šterky, hlíny, rašelina apod.). Souvisejícím pojmem je úrodnost půdy, tedy schopnost půdy poskytovat životní podmínky pro rostliny i edafon. Úrodnost je dána souborem fyzikálních, fyzikálně-chemických, chemických a biologických vlastností půdy [5].

Mimoprodukční funkce jsou funkce neméně podstatné, jejichž jakékoliv narušení může mít rozsáhlé následky. Do této skupiny se řadí funkce filtrační, akumulární a retenční, puфраční, transportní a asanační a funkce transformační. Transformačními funkcemi jsou myšleny rozkladné i syntetické procesy. K rozkladným patří dekompozice odumřelé biomasy a uvolnění živin, či degradace pesticidů a jiných organických kontaminantů. Mezi syntetické procesy se řadí tvorba stabilních humusových látek, která zajišťuje sekvestraci uhlíku v půdě. Půda má dále také funkci genové rezervy a vytváří životní prostor pro organismy. Další vlastností půdy je schopnost zadržet obrovská množství vody, což umožňuje život vyšších rostlin i všech půdních organismů [5,6].

## 2.1.2 Složení půdy

Půda představuje heterogenní polydisperzní systém, v němž je zastoupena fáze kapalná, plynná i pevná. Pevná část půdy je pak dále rozdělena na minerální a organický podíl. Každá fáze půdy má zcela zásadní vliv na produkční a mimoprodukční funkce půdy. Procentuální zastoupení jednotlivých půdních složek je přehledně znázorněno na Obrázku 2.



Obrázek 2: Přibližné zastoupení jednotlivých půdních složek v hmotnostních % [7]

### ***Kapalná složka***

Kapalná složka půdy bývá z pohledu půdní chemie označována jako tzv. půdní roztok, který je známý také pod termínem půdní voda. Tento termín se však častěji používá v souvislostech s půdní fyzikou. Kapalnou fází půdy tedy tvoří voda (kapilární a gravitační), ve které jsou rozpuštěny minerální a organické sloučeniny, nasycené oxidem uhličitým a kyslíkem. Hlavní funkcí půdního roztoku je zajištění pohybu látek a průběhu chemických reakcí. Slouží také jako zdroj potřebných látek pro organismy a zároveň vytváří vhodné prostředí pro jejich život. Koncentrace půdního roztoku se mění v závislosti na působení řady fyzikálních, chemických a biologických procesů v souvislosti s vlhkostí, teplotou, aerací půdy, složením pevné fáze půdy aj. Tyto podmínky pak ovlivňují obsah minerálních a organických látek obsažených v půdním roztoku. Minerálními látkami nejčastěji se vyskytujícími v půdním roztoku jsou zvláště kationty  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  a  $H^+$ . Především v kyselých půdách se objevují rozpuštěné sloučeniny  $Al^{3+}$  a  $Fe^{3+}$ . Další mikrobiogenní prvky ( $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  aj.) jsou zde obsaženy pouze v nízkých koncentracích. Půdní roztok obsahuje mimo jiné také anionty  $HCO_3^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $H_2PO_4^-$ . Mezi organické látky vyskytující se v půdním roztoku se řadí především organické kyseliny, aminokyseliny, sacharidy a jistý podíl rozpustných humusových látek [5,8].

### ***Plynná složka***

Plynnou složku půdy tvoří půdní vzduch, který spolu s půdním roztokem vyplňuje všechny volné póry v půdě. Dostatek vzduchu v půdě je zárukou dýchání půdních organismů i kořenů rostlin a průběhu řady biologických i biochemických přeměn a chemických reakcí v půdě [5].

Šimek [1] ve své práci uvádí, že složení půdního vzduchu je téměř totožné jako složení vzduchu atmosférického. Půdní vzduch má však nižší obsah kyslíku (cca 20–10 % obj.) a vyšší obsah oxidu uhličitého (cca 0,1–5 % obj.) než atmosférický vzduch. Obsah dusíku se většinou liší v rozsahu několika procent v důsledku kolísání celkového obsahu  $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$ . Obsah argonu spolu s dalšími inertními plyny zůstává v půdním vzduchu prakticky stejný jako ve vzduchu atmosférickém.

### ***Minerální podíl půdy***

Materiálním základem minerálního podílu půdy je minerální substrát, který vzniká zvětráváním matečných hornin a substrátů. Minerální podíl je tvořen nejrůznějšími anorganickými sloučeninami a částicemi rozmanitých velikostí, od koloidních částic až po balvany. Se zmenšující se velikostí částic minerálního podílu půdy dochází ke zvětšování jejich specifické povrchové plochy a vzájemných přitažlivých sil mezi částicemi. Dochází také k zesílení kohezních a adhezních funkcí půdy, což vede k ovlivnění téměř všech půdních vlastností. Půdní částice se vyskytují v půdě izolovaně nebo tvoří agregáty společně s jinými částicemi. Tyto agregáty mohou mít tvar granulí, desek, bloků, hranolů, sloupců apod. Vzniká tak struktura půdy [6,9].

Šimek [1] klasifikuje minerály podle jejich vzniku do dvou kategorií – primární a sekundární. Primární minerály vznikají krystalizací přímo z magmatu a řadí se mezi ně křemičitany ( $\text{SiO}_4^{4-}$ ), uhličitan ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), fosforečnan ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) a sírany ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Na druhé straně, sekundární minerály jsou vytvářeny různými přeměnami z nerostů primárních a jedná se převážně o jílové minerály. Přeměna primárních minerálů na sekundární významně ovlivňuje některé půdní vlastnosti (např. půdní sorpční komplex), díky čemuž se tyto minerály staly nepostradatelnou součástí půdy.

Proces, při kterém se prvky obsažené v horninách a minerálech uvolňují a přecházejí do jiných forem, je nazýván zvětráváním. Tento proces je důležitý pro zapojení do koloběhu látek v prostředí. Ke zvětrávání dochází v důsledku interakce horniny s atmosférou, hydrosférou a biosférou. Ty na ni působí fyzikálně, biologicky a chemicky. Podle Pavlů [5] vede fyzikální zvětrávání ke vzniku drobných či větších úlomků hornin. Tento proces může být způsoben různými faktory, například změnou teploty, změnou skupenství vody v pórech nebo mechanickým obrušováním. Biologické zvětrávání je specifické současným působením fyzikálních a chemických procesů způsobených živými organismy. Příkladem může být prorůstání kořenů do puklin nebo produkce kyselých kořenových exsudátů. Při chemickém zvětrávání, které probíhá nejlépe v teplých a vlhkých oblastech, dochází ke čtyřem základním procesům. Jedná se konkrétně o hydrataci, oxidaci, redukci a hydrolýzu. Toto zvětrávání dává vzniknout sekundárním minerálům, jako jsou jílové materiály a nerozpustné oxidy. Tvorba konečných produktů chemického zvětrávání je závislá především na složení matečné horniny a na prostředí, ve kterém k ní dochází [5].

## 2.2 Půdní organická hmota

Pojmem půdní organická hmota (*soil organic matter*, SOM) je popisován složitý a dynamický soubor organických látek různého původu, který neustále podléhá procesům rozkladu. Stevenson [10] v roce 1982 definoval půdní organickou hmotu jako rozkládající se vstupní materiál, který se skládá z odumřelých zbytků rostlin a živočichů v různém stupni rozkladu a nezahrnuje jejich nerozložené tkáně, organické zbytky a živé mikrobiální tkáně. Kromě toho zavedl také zaměnitelné používání pojmů *půdní organická hmota* a *humus*.

Půdní organická hmota reprezentuje zhruba 6 % z celkové hmotnosti půdy, přičemž zbylých 94 % pak tvoří minerální podíl. SOM je považována za nejdůležitější část půdy, jelikož určuje fyzikální, chemické i biologické vlastnosti půdy. Představuje také velmi významnou část organického uhlíku v biosféře a při určitých podmínkách prostředí může redukovat uvolňování skleníkových plynů z půdy [11].

Organická část půdy je tvořena živou a neživou částí. Obě tyto části jsou na sobě závislé a mají vliv na celkovou biologii půdy a na mineralizační a imobilizační procesy, včetně složitých transformací organických látek a jejich stabilizaci v půdě. Živá část představuje přibližně 15 % veškeré organické hmoty. Nejrozsáhlejší skupinou tvořící živou část je mikroedafon, který je tvořen bakteriemi, houbami, sinicemi či aktinomycety. Mikroedafon se podílí na většině transformačních procesů. Další součástí živé části organického podílu jsou rostliny, zejména jejich kořenový systém, který má značný vliv na biologické a chemické procesy v období vegetace. Neživá část tvoří zbylých 85 % půdní organické hmoty a je dělena do dvou základních skupin, a to na primární organickou hmotu a huminové látky. Tyto skupiny je nutné rozlišovat, jelikož jejich funkce v půdě jsou značně odlišné. Primární organická hmota je tvořena především zbytky rostlin, půdní mikroflóry, organických hnojiv a živočichů v různém stupni rozkladu. Většina dodané půdní organické hmoty podléhá mineralizaci, zatímco pouze její malá část zůstává v půdě a účastní se řady přeměn a reakcí, při kterých dochází ke vzniku huminových látek [8,12].

### 2.2.1 Mineralizace

Mineralizací je popisován soubor fyzikálních, chemických a především biologických přeměn a procesů, kterými prochází nerozložená odumřelá organická hmota a zapojuje se tak do potravních řetězců a tím i do toků látek a energie. Tyto procesy patří mezi základní složky pedogeneze. Podílejí se totiž na tvorbě půdní struktury, na půdní úrodnosti, schopnosti zadržovat vodu, živiny i cizorodé látky v půdě. Mineralizace popisuje rozklad organických látek přes řadu meziproductů až na látky jednoduché, jako jsou CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>, oxidy různých prvků a další, které jsou klíčové pro růst rostlin a další organismy. Tento proces probíhá za příznivých teplotních a vlhkostních podmínek, a to zejména v půdách, které podléhají silné aeraci. Zmíněné podmínky silně podporují činnost půdních mikroorganismů, které hrají v rozkladu organické hmoty na výše uvedené složky významnou roli. Za těchto podmínek se humus ihned rozkládá a nedochází k tvorbě nového [5,11].

Rozklad organické hmoty mineralizací je proces exotermický, dochází tedy k uvolňování energie. Rychlost mineralizace je ovlivněna půdními podmínkami (teplota, vlhkost, aerace půdy, pH, obsah dusíkatých látek apod.), a také kvalitou jednotlivých komponentů primární organické hmoty [5,11].

Pospíšilová [11] ve své práci rozděluje mineralizační proces na primární a sekundární mineralizaci. Primární mineralizace je poměrně rychlý proces, který trvá týdny až několik let a dochází při něm k přeměně humusotvorného materiálu na jednodušší nehumusové látky. Produkty primární mineralizace mohou být uvolňovány ve formě plynů do vzduchu ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ), případně se stávají zdrojem výživy rostlin a mikroorganismů ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_3^{2-}$ ), nebo součástí půdního sorpčního komplexu ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}^+$ ). V krajních případech může dojít k vyplavení produktů z půdy do podzemních vod ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). Sekundární mineralizací jsou myšleny procesy rozkladu humifikovaných organických zbytků. Tento proces je na rozdíl od primární mineralizace velmi pomalý, odhadem trvá desítky let až století.

### 2.2.2 Ulmifikace a karbonizace

Ulmifikace (rašelinění) a karbonizace (uhelnatění) jsou extrémními procesy přeměny organické hmoty. Oba procesy probíhají za výrazně omezeného přístupu vzduchu nebo za anaerobních podmínek (při nedostatečné oxidaci). Jedná se o procesy výhradně enzymatické a biochemické. Při ulmifikaci podléhá biodegradaci pouze část výchozího materiálu (bílkoviny, celulóza), jelikož dochází k ukládání polyfenolproteinových komplexů na buněčných stěnách. Konečnými produkty jsou huminové a ulminové látky s tmavohnědým až černým zbarvením a vysokým obsahem uhlíku (rašeliny a bitumeny) [9]. Jak ve své práci uvádí Szombathová [13], rozlišovány jsou dva typy rašeliny, a to vrchoviště (obsahují méně huminových kyselin a více hemicelulózy a bitumenů) a slatiny (obsahují více huminových kyselin a méně hemicelulózy a bitumenů). Při karbonizaci dochází ke vzniku tzv. humusového uhlí. Toto uhlí má tmavé zbarvení a obsahuje ve své struktuře poměrně více uhlíku, a naopak méně kyslíku, dusíku a vodíku než výchozí materiál.

### 2.2.3 Humifikace

Humifikací se rozumí proces přeměny odumřelého rostlinného a živočišného materiálu, při kterém dochází ke vzniku huminových látek (HL). Tento půdní proces zahrnuje velký soubor na sebe navazujících biochemických a enzymatických reakcí a je doprovázen mineralizací výchozích látek. Z tohoto důvodu nikdy nedojde k humifikaci veškerého výchozího organického materiálu [9,14].

Huminové látky vznikající v tomto půdním procesu jsou považovány za nejdůležitější část půdní organické hmoty. Bylo prokázáno, že mají pozitivní vliv na vlastnosti a úrodnost půdy a také se vyznačují schopností zadržovat vodu a potřebné živiny v půdě. HL jsou běžně děleny na základě jejich odolnosti vůči rozkladu a rozpustnosti v kyselých či alkalických roztocích na tři frakce, kterými jsou huminové kyseliny, fulvinové kyseliny a huminy [9,12].

Huminové kyseliny jsou charakteristické svou rozpustností v alkalických roztocích, ale jsou nerozpustné po okyselení alkalického extraktu. Naproti tomu fulvinové kyseliny jsou rozpustné v celém rozsahu hodnot pH a huminy nejsou rozpustné ani v alkalických, ani kyselých roztocích [9,12].

Navzdory důležité roli HL v půdě a půdních procesech nebyla doposud přesně definována jejich struktura. Z historického hlediska se kvůli omezenému množství dostupných analytických metod, a tedy i omezeným možnostem charakterizace HL předpokládalo, že jsou HL tvořeny polymery s různou molekulovou hmotností a přesně definovanou strukturou. Tento pohled na HL byl podpořen mnoha výzkumy [10,15,16] a na jeho základě bylo navrženo hned několik různých potenciálních strukturních modelů HL. Značný zlom ve výzkumu HL přišel spolu s pokrokem na poli analytických metod. Nově se rozvíjející metody, především  $^{13}\text{C}$ -NMR spektroskopie, gelová permeační chromatografie, *pyrolysis-field ionization* hmotnostní spektroskopie či elektronová spinová rezonance začaly poskytovat data, na základě kterých začaly být zjevné určité nedostatky v polymerní definici HL a začalo být jasné, že struktura HL bude podstatně složitější a komplexnější, než se původně předpokládalo [14]. V roce 2001 představil Piccolo [17] koncept supramolekulární struktury HL. Ve své práci tvrdil, že HL jsou supramolekulárními asociacemi samouspořádaných heterogenních molekul s nízkou relativní molekulovou hmotností (200–300 Da). Huminové suprastruktury by pak měly být stabilizovány pomocí slabých vazebných interakcí (van der Waalsovy síly, H-můstky, hydrofobní interakce apod.), které určují konformační strukturu HL, čímž mají dopad i na jejich reaktivitu v životním prostředí.

Autoři Sutton a Sposito [18] v roce 2005 přišli s článkem, ve kterém se snažili přehodnotit tradiční pohled na molekulární strukturu huminových látek v půdě a navrhnout nový pohled, který se opírá o nové poznatky a technologie. Podle nich jsou HL složeny z poměrně jednoduchých molekul spojených navzájem kovalentními vazbami. Tyto molekuly by měly mít určitou podobnost s molekulami nacházejícími se ve stěnách a extracelulárním matrix rostlin.

V současné době stále existuje také mnoho nejasností i co se týče samotného vzniku HL. Doposud nebyl objasněn přesný mechanismus humifikace, a proto výzkum v této oblasti stále pokračuje. Momentálně jsou mezi tři nejuznávanější teorie vzniku HL řazeny teorie ligninová, polyfenolová a teorie dle Maillarda. Jednotlivé teorie jsou uvedeny v pořadí, v jakém byly publikovány a za zmínku stojí fakt, že se tyto teorie navzájem nevylučují. Ligninová teorie považuje za hlavní prekursor vzniku HL tzv. modifikovaný lignin, jehož zbytek, který není využit půdními mikroorganismy, se stává součástí půdního humusu. Následně byla představena teorie polyfenolová, která je založena na tvrzení, že prekursor pro vznik HL jsou právě polyfenolické látky. Teorie dle Maillarda, taktéž známá jako kondenzace sacharidů s aminy, jako jediná více zohlednila vliv půdních bakterií a mikroorganismů na proces tvorby HL [9,14].

Další zajímavá teorie týkající se vzniku huminových látek přichází s konceptem, že na tvorbu půdní organické hmoty mají vliv i sekundární metabolity půdních mikroorganismů, tzv. polyketidy. Polyketidy jsou obecně definovány jako organické sloučeniny obsahující ve své struktuře typicky několik karboxylových a hydroxylových skupin. Obecně jsou syntetizovány a produkovány bakteriemi nebo rostlinami. Polyketidy se vyznačují řadou důležitých schopností a funkcí. Za zmínku stojí například jejich antibiotická a antifungální aktivita a také schopnost ničit rakovinové buňky, díky čemuž jsou využívány jako chemoterapeutika. Dle tohoto modelu se polyketidy mohou podílet na tvorbě HL hned několika způsoby. Půdní mikroorganismy mohou odbourávat polyketidy, což vede ke vzniku meziproductů, které se dále mohou měnit na HL. Dalším způsobem je samotné začlenění polyketidů do struktury HL. To se děje opět prostřednictvím půdních mikroorganismů, které mohou odštěpit některé jejich funkční skupiny a následně je spojit s jinými organickými sloučeninami. Dochází tak k tvorbě velkých molekulárních struktur huminových látek [14].

Ohledně existence huminových látek však kvůli dlouhodobé neúspěšnosti určit jejich strukturu panuje určitá kontroverze. Někteří vědci tvrdí, že tyto látky jsou pouze součástí směsi organických látek v půdě a nahlíží na SOM jako na rezervoár zbytků rostlin a živočichů. Tyto zbytky se budou postupně rozkládat, přičemž ale nebudou podléhat procesu humifikace. Touto problematikou se zabývají ve svém článku například Lehmann a Kleber [19].

## **2.3 Půdní mikroorganismy**

Půdní mikroorganismy reprezentují živou složku půdy. Půda a její neživé složky pro ně představují vhodné životní prostředí. Právě díky činnosti těchto půdních organismů se z půdy stal unikátní přírodní dynamický objekt s charakteristickými vlastnostmi a funkcemi. Obecně platí, že hladina mikroorganismů v půdě koreluje s hladinou organické hmoty, která je spojena především s horními 30–40 cm půdy. Za vhodných vlhkostních a teplotních podmínek podporuje daná půda určité množství organismů s typickým složením. Množství i složení organismů je však závislé na změně podmínek [1,20].

Půdní mikroorganismy vynikají schopností adaptace na jakékoliv prostředí, včetně extrémních přírodních podmínek i toxických podmínek vytvořených člověkem. Délka jejich života může být i několik milionů let. Různé skupiny půdních mikroorganismů mohou mít potenciální využití v zemědělství. Tyto skupiny zahrnují například symbiotické, dusík fixující *Rhizobia*, také volně žijící bakterie, jako je *Azotobacter spp.* a *Azospirillum spp.*, nebo vezikulární arbuskulární a ektomykorhizní houby a biokontrolní činnidla, jako je *Trichoderma spp.* [1,20,21].

### **2.3.1 Role v půdě a význam pro rostlinu**

Půdní mikroorganismy tvoří rozsáhlou systematickou skupinu bakterií, aktinomycet, hub, prvoků, kvasinek a řas. Tyto mikroorganismy v interakci s půdními živočichy zabezpečují nepřetržitý tok látek a energie půdou: rozkladné a syntetické procesy, procesy přeměn jednotlivých prvků a živin, interakce mezi půdou a jejím okolím.



Půdní mikroorganismy mají schopnost rozložit jakoukoliv organickou hmotu a bez nich by nebylo možné zahájit rozklad složitých organických polymerů ani dokončit závěrečnou mineralizační fázi rozkladu organické hmoty. Další důležitou funkcí je stimulace růstu rostlin produkcí fytohormonů a regulace fytopatogenů pomocí různých sekundárních metabolitů. Většina půdních mikroorganismů ale zůstává prozatím neprostudována z důvodu jejich nekultivovatelnosti, tzn. stavu, kdy je nelze dostupnou kultivační technikou rozmnožit v laboratorních podmínkách a dále studovat jejich vlastnosti [1,22].

### **2.3.2 Degradace půdy**

Degradace půdy je proces, při kterém dochází ke znehodnocení půdy, snížení její úrodnosti a využitelnosti. Rychlost degradace půd závisí nejen na působení okolního prostředí, ale také na vnitřních vlastnostech samotné půdy. Taktéž intenzita procesu degradace půdy je ovlivněna vnějšími působícími faktory, mezi které jsou zahrnuty způsob hospodaření, extrémní projevy počasí, změny klimatu apod. Vopravil [23] ve své práci uvádí výčet nejběžnějších degradačních faktorů, které mají velký vliv na produkční a mimoprodukční funkce půdy. Patří sem ztráta půdní biodiverzity, změna klimatu, eroze půdy a ztráta půdní organické hmoty, acidifikace půd a v neposlední řadě kontaminace půd polutanty. Jednotlivé degradační procesy jsou na sobě závislé a vyvolávají obvykle řetězovou reakci dalších degradačních procesů poškozujících půdu [23,24].

Borůvka [25] ve své práci dělí degradační procesy na fyzikální a chemické. Fyzikální degradace spočívá v poškození půdní struktury a řadí se sem např. vodní a větrná eroze, desertifikace, utužení a zábory půd. Chemická degradace je spojená s kontaminací půd rizikovými látkami, jako jsou těžké kovy, kyselé imise, pesticidy aj. Dále mezi chemickou degradací patří acidifikace (tj. snížení pufrací schopnosti půdy) a salinizace půd (tj. hromadění rozpustných anorganických solí v půdě), odčerpání a vyplavení živin, změny v kvalitě půdní organické hmoty a od tohoto se odvíjející eutrofizace vod (tj. přemnožení mikroorganismů ve vodním zdroji z důvodu zvýšené koncentrace živin, hlavně fosfátů).

### **2.3.3 Rhizobium spp.**

Bakteriální rod *Rhizobium* se řadí mezi aerobní, chemoorganotrofní, gramnegativní tyčinky, které se vyznačují schopností vázat vzdušný dusík, redukovat ho na amoniak a žít v symbióze s kořeny rostlin. *Rhizobia* také hraje významnou roli při sekreci růstových hormonů, jako je kyselina indolactová (IAA), která vykazuje pozitivní vliv na růst rostlin, a také plní hlavní funkci při tvorbě a vývoji kořenových uzlíků [21].

*Rhizobia* jsou složkou rhizosféry, což je oblast povrchu a nejbližšího okolí kořenů rostlin. V závislosti na vzdálenosti od kořenů rostlin jsou rhizobakterie rozděleny na bakterie přítomné v půdě blízko kořenů, bakterie přítomné na povrchu kořene (rhizoplane), bakterie obývající kořenovou tkáň (endofyty, obývající prostory mezi kortikálními buňkami) a bakterie sídlící v buňkách specifických struktur nazývaných kořenové uzliny. Optimální teplota pro růst těchto bakterií je 25–30 °C.

Některé druhy potřebují pro svůj růst biotin, thiamin a pantothenát. Jedná se o druhy specifické pro růst na aminokyselinách, proto je potřeba růst jednotlivých druhů kontrolovat individuálně [21,22].

Mezi pozitivní funkce Rhizobií patří schopnost poskytovat hostitelským rostlinám toleranci vůči stresu prostřednictvím procesu zvaného indukovaná systémová tolerance. Dále hrají důležitou roli i při solubilizaci fosfátů, jelikož fosfor je po dusíku druhá nejdůležitější živina potřebná pro růst rostlin. Taktéž jsou tyto bakteriální druhy schopny syntetizovat nízkomolekulární sloučeniny zvané *siderofory*, které chelatují železo. Železo se rovněž řadí mezi základní rostlinné mikroživiny a jeho koncentrace v půdě se pohybuje v rozmezí 0,2–55 %. Na přítomnosti železa je vysoce závislá symbiotická fixace dusíku, protože proteinové složky funkčních dusíkatých látek vyžadují kov. Některé rhizobiální druhy navíc vykazují vlastnosti biologické kontroly, což je proces, kterým živý organismus omezuje růst nebo šíření nežádoucích organismů nebo patogenů. Použití těchto kmenů proti půdním patogenům a škůdcům může vést k ekologickému managementu škůdců a chorob v zemědělských oblastech. Mechanismy biologické kontroly rhizobií zahrnují konkurenci o živiny, produkci antibiotik, produkci enzymů pro degradaci buněčných stěn a produkci již zmíněných sideroforů [21,22].

#### **2.3.4 Azotobacter spp.**

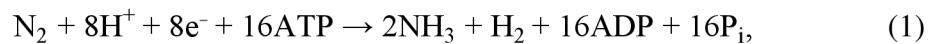
Azotobacter spp. jsou gramnegativní, aerobní, oválné nebo kulovité bakterie, které tvoří tlustostěnné cysty. Jejich výskyt je mnohem hojnější v rhizosféře rostlin než v okolní půdě. Rod Azotobacter zahrnuje v současnosti šest druhů, z nichž některé jsou pohyblivé pomocí peritrichózních bičků. Jsou typicky polymorfní s délkou 2–10  $\mu\text{m}$  a šířkou 1–2  $\mu\text{m}$ . Tyto bakterie jsou citlivé na kyselé pH, vysoký obsah solí a teplotu. Hlavními funkcemi, které v půdě vykonávají, jsou výnosy prostřednictvím biosyntézy biologicky aktivních látek, stimulace rhizosférických mikrobů a produkce fytopatogenních inhibitorů a současně mají příznivé účinky na růst plodin. Azotobacter využívají atmosférický plynný dusík pro syntézu buněčného proteinu, který je poté po smrti buněk Azotobacter mineralizován v půdě, a tím je přispíváno k dostupnosti dusíku. Velký význam mohou mít při inokulaci semen, čímž se přispívá ke zvýšení výnosu tím, že semeno naočkované Azotobacter pomáhá při příjmu dusíku a fosforu spolu s mikroživinami, jako je železo a zinek. Azotobacter produkují thiamin, riboflavin, nikotin, kyselinu indolactovou a giberelin a taktéž syntetizují růstové hormony (tj. auxiny, cytokininy). Podobně jako Rhizobia jsou Azotobacter schopny produkovat siderofory, váží se na dostupnou formu železa ( $\text{Fe}^{3+}$ ) v rhizosféře, čímž se stávají nedostupnými pro fytopatogeny a chrání zdraví rostlin [26].

#### **2.4 Fixace a koloběh dusíku v půdě**

Dusík se řadí mezi nejdůležitější prvky potřebné pro růst rostlin a je nezbytný pro syntézu nukleových kyselin, enzymů, proteinů a chlorofylu. Na jeho dostupnost má významný vliv množství a povaha půdní organické hmoty. Cyklus dusíku v půdě je významnou součástí celkového cyklu dusíku v přírodě. Přestože 78 % dusíku je k dispozici v atmosféře v plynné formě, rostliny postrádají schopnost jej přímo asimilovat [20].

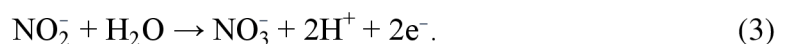
Dusík ze vzduchu vstupuje do koloběhu dusíku díky působení unikátních typů mikroorganismů, které dokážou přeměnit plynný dusík na jeho anorganické formy dostupné rostlinám. Těmito mikroorganismy jsou asymbiotická, volně žijící prokaryota, která žijí v půdě (např. *Azotobacter sp.*, *Clostridium sp.*). Tyto organismy vyžadují k fixaci molekulárního dusíku zdroj uhlíku a energie ve formě dostupných sacharidů [22,27].

Biologickou fixací dusíku vznikají z 1 molu plynného dusíku 2 moly amoniaku. Tento proces lze znázornit rovnicí (1):



kde ATP je adenosintrifosfát, ADP je adenosindifosfát a  $\text{P}_i$  je anorganický fosfát.

Produkt fixace dusíku je obecně používán přímo volnými bakteriemi fixujícími dusík nebo je exportován do rostlin symbiotickými bakteriemi fixujícími dusík. Exportovaný dusík je využíván rostlinami k syntéze organických sloučenin dusíku, přičemž tyto organické sloučeniny dusíku jsou využívány zvířaty jako zdroj dusíku. Po smrti organismu je organický dusík (tzn. proteiny, aminokyseliny a nukleové kyseliny) degradován mikroorganismy na amoniak. V půdě jsou za pomoci mikroorganismů mineralizovány taktéž močovina a kyselina močová, které jsou vylučovány živými zvířaty. Vyrobený amoniak pak může být fixován jílly nebo půdní organickou hmotou, odpařen jako  $\text{NH}_3$ , nebo asimilován rostlinami a mikroorganismy anebo nakonec přeměněn na dusičnany za pomoci vysoce specializovaných bakterií pomocí nitrifikace, která proběhne ve dvou krocích. V prvním kroku nitrifikace se amoniak oxiduje na dusitany pomocí rovnice (2) a ve druhém kroku se dusitany oxidují na dusičnany bez detekovatelných meziproductů (3) [28].



Přeměnou imobilní formy dusíku  $\text{NH}_4^+$  na vysoce mobilní formu  $\text{NO}_3^-$  pomocí nitrifikace může docházet ke ztrátám dusíku z půdy (např. odtokem a vyplavováním), což může vést k akumulaci dusičnanů v jezerech, podzemních vodách a řekách. Současně má nitrifikace význam při aerobním čištění odpadních vod, kdy je amoniak z amonifikace oxidován na dusičnany. Dusičnan vzniklý nitrifikací může být asimilován kořeny rostlin a bakteriemi nebo použit jako terminální akceptor elektronů mikroorganismy za omezeného přístupu kyslíku [28].

Redukce dusičnanů na plynný dusík v anaerobním prostředí probíhá čtyřstupňovým reakčním procesem. Tento proces je nazýván denitrifikace a jedná se o mikrobiální respirační proces, při kterém se dusičnany za působení bakterií a omezeného množství vzduchu redukují až na molekulární dusík. Denitrifikace je zodpovědná za návrat fixovaného dusíku do atmosféry, čímž se uzavírá N cyklus [28].

Další možností je redukce dusičnanů produkovaných nitrifikací na amoniak buď respiračními nebo disimilačními procesy. Při respirační redukci dusičnanů na amoniak je redukce dusitanů spojena s tvorbou elektrochemického gradientu na membráně.

Tato redukce je prováděna bez uvolňování meziproductů. Podobně jako denitrifikace se tato respirační dusičnanová amonifikace provádí za anaerobních podmínek. Naproti tomu při disimilační redukci dusičnanů na amoniak dusitan pohlcuje elektrony k regeneraci  $\text{NAD}^+$  (tj. koenzym sloužící jako oxidačně-redukční činidlo v biochemických reakcích) a k detoxikaci dusitanů, které se nahromadily v buňkách redukujících dusičnany. Pouze první krok této amonifikace (tj. redukce dusičnanů na dusitany) je spojen s produkcí energie u většiny mikroorganismů [1,28].

## 2.5 Půdní enzymy

Půdní enzymy jsou definovány jako katalyzátory půdních biochemických procesů, což znamená, že zvyšují rychlost reakcí, při kterých dochází k mineralizaci půdní organické hmoty. Tyto reakce jsou navíc specifické tím, že probíhají při nižších teplotách, v průběhu nedochází ke vzniku vedlejších produktů a jsou velmi citlivě regulovány. Půdní enzymy produkované buňkami půdního edafonu a jejich aktivita úzce souvisí s kvalitou a kvantitou půdní organické hmoty, fyzikálními a chemickými vlastnostmi půdy a s aktivitou půdních mikroorganismů [29].

Podle místa působení lze enzymy rozdělit na intracelulární (vnitrobuněčné, také endoenzymy) a extracelulární (mimobuněčné, také exoenzymy). Intracelulární enzymy se vyskytují zásadně uvnitř buňky, ve které byly syntetizovány buď jako součást buněčné cytoplazmy, nebo jsou vázány na jejich buněčné stěny. Jedny z významných intracelulárních enzymů jsou například  $\beta$ -galaktosidáza, dehydrogenáza a další enzymy glykolýzy. Na rozdíl od intracelulárních enzymů jsou extracelulární enzymy vylučovány do mimobuněčného prostoru, kde katalyzují hydrolýzu látek pro výživu buňky. Produkty hydrolýzy mají menší velikost a následně prostupují do buňky, kde dochází k jejich dalšímu rozkladu. Patří sem například některé hydrolázy, jako je amyláza [29].

Rozdělení půdních enzymů zavedla v roce 1961 Enzymová komise mezinárodní unie biochemie a molekulární biologie (IUBMB). Enzymy jsou klasifikovány pomocí *enzyme commission* (EC) čísel do šesti tříd podle typu reakcí, které katalyzují:

EC 1 – *oxidoreduktázy*: katalyzují redoxní děje (dehydrogenázy, oxidázy, oxygenázy, hydroxylázy, cytochromy),

EC 2 – *transferázy*: přenášejí funkční skupiny (aminotransferázy, transglykosylázy, transmethylázy, hexokinázy),

EC 3 – *hydrolázy*: katalyzují hydrolytické štěpení (proteázy, lipázy, esterázy, glykosidázy),

EC 4 – *lyázy*: štěpí C-C a C-N vazby bez vstupu vody (aldolázy),

EC 5 – *izomerázy*: katalyzují isomerizační reakce (cis-trans isomerázy, epimerázy, mutázy, racemázy),

EC 6 – *ligázy* (synthetázy): spojují dvě molekuly kovalentní vazbou za spotřeby ATP.

### 2.5.1 Role a význam

Půdní enzymy mohou reagovat na změny v hospodaření s půdou rychleji než jiné půdní komponenty, a proto mohou být užitečné jako časné indikátory biologických změn a mají také velký vliv na koloběh prvků v přírodě. V koloběhu uhlíku se uplatňují enzymy amyláza, celulóza, xylanáza, glukosidáza a invertáza. Koloběh dusíku ovlivňují proteáza, amidáza, ureáza a deamináza. Na koloběhu fosforu se podílí enzym fosfatáza a na koloběhu síry enzym arylsulfatáza [30].

Půdní enzymy dále hrají důležitou roli při rozkladu organických látek. Některé enzymy pouze usnadňují štěpení organické hmoty (hydroláza, glukosidáza), zatímco jiné se podílejí na mineralizaci živin (amidáza, ureáza, fosfatáza, sulfatáza). Ureáza je známá tím, že katalyzuje hydrolýzu močoviny na amoniak a CO<sub>2</sub>, fosfatáza katalyzuje hydrolýzu fosfátových esterů na orthofosfát a odpovídající ester [29,31].

### 2.5.2 Dehydrogenáza

Biochemické reakce, které probíhají v půdě, jsou závislé na přítomnosti jednotlivých skupin enzymů, jež jsou ovlivňovány mnoha faktory. Mezi nejvíce studované skupiny patří oxidoreduktázy, transferázy a hydrolázy, které se uplatňují při přeměně organické hmoty a při zpřístupňování anorganických živin pro rostliny, avšak největší pozornost je věnována dehydrogenázám [32,33,34].

Dehydrogenázy patří mezi oxidoreduktázy a v půdě se účastní oxidačních procesů organických složek. Půdní dehydrogenázy se užívají jako ukazatel celkové půdní mikrobiální aktivity, protože jsou esenciální intracelulární součástí všech živých buněk, a přitom se nehromadí extracelulárně v půdním prostředí. Dehydrogenázy, jakožto enzymy dýchacího řetězce, hrají významnou roli v biologické oxidaci organické hmoty přenosem vodíku z organických substrátů pro anorganické akceptory a jsou zapojeny do redukčních procesů biosyntézy. Aktivita dehydrogenázy v půdě je výsledkem řady dehydrogenáz, které jsou důležitými složkami enzymatických systémů mikroorganismů. Dehydrogenázová aktivita (DHA) tedy slouží jako indikátor mikrobiologických redoxních systémů, může být považována za dobře vypovídající měřítko mikrobiálních oxidačních aktivit v půdě a je také považována za úměrnou biomase mikroorganismů v půdě [32,33,34].

## 2.6 Plazma

Plazma je definováno jako čtvrté skupenství hmoty. Jedná se o částečně nebo zcela ionizovaný plyn, který se pak vyznačuje naprosto odlišnými vlastnostmi od plynů i kapalin. Obecná definice plazmatu zní: „*Plazma je kvazineutrální ionizovaný plyn nabitých a neutrálních částic, který vykazuje kolektivní chování*“. Pojem kvazineutralita je označován stav, kdy se koncentrace kladně nabitých částic (kationtů) a záporně nabitých částic (elektronů i aniontů) v oblasti plazmatu přibližně rovnají. To způsobuje navenek elektricky neutrální chování plazmatu navzdory tomu, že obsahuje elektricky nabitě částice. Kolektivním chováním jsou pak popisovány pohyby, které závisí na lokálních podmínkách a také na stavu plazmatu ve vzdálených oblastech [35].

Jedním z projevů kolektivního chování částic v plazmatu je děj zvaný Debyeovo stínění. Tento děj je pozorován v přítomnosti pevné látky v plazmatu, kde pevná látka nese náboj, ale ten je díky kvazineutralitě odstíněn. Ve vzdálenosti zvané Debyeova stínící délka je plazma opět kvazineutrální. Jestliže do předpokládaného homogenního plazmatu vložíme nepohyblivý náboj  $q$ , částice se souhlasným nábojem jsou jím odpuzované, s nesouhlasným přitahované. Plazma se proto polarizuje a elektrické pole vloženého náboje tím pádem odstíní. Odstíněním klesne potenciál elektrického pole v plazmatu oproti potenciálu elektrického pole ve vakuu na  $1/e$  ve vzdálenosti rovné Debyeově stínící délce. Výpočet se provádí pomocí vztahu (4):

$$\lambda_D = \left( \frac{\epsilon_0 \cdot k \cdot T_e}{n \cdot e^2} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (4)$$

kde  $\epsilon_0$  je permitivita vakua,  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $T_e$  je teplota charakterizující střední kinetickou energii kladných elektronů,  $n$  je hustota nabitých částic a  $e$  je náboj elektronu [35,36].

Kolektivní chování plazmatu je podmíněno třemi kritérii. První z nich říká, že hustota nábojů musí být tak velká, že Debyeova délka je mnohem menší než velikost systému ( $\lambda_D \ll L$ ). Další kritérium se týká počtu částic v Debyeově sféře, který musí být mnohem větší než jedna ( $N_D \gg 1$ ). Pokud by se v oblasti stínící vrstvy vyskytovala pouze jedna či dvě částice, tak by pojem Debyeova stínění nemohl být statisticky platný. Poslední podmínka, kterou se plazma odlišuje od plynu, souvisí s počtem srážek nabitých částic a neutrálních atomů a říká, že součin frekvence plazmových oscilací  $\omega$  a střední doby  $\tau$  mezi srážkami s neutrálními atomy musí být větší než jedna ( $\omega\tau > 1$ ) [36,37].

### 2.6.1 Klasifikace plazmatu

Existuje několik způsobů, podle kterých je možné plazma dělit. Jedním ze základních parametrů plazmatu je stupeň ionizace. Ten je udáván jako poměr počtu ionizovaných částic ku celkovému počtu částic v daném systému. Ionizační stupeň má největší vliv na chování plazmatu a je závislý především na teplotě.

Přibližná hodnota ionizačního stupně se určuje pomocí Sahovy rovnice (5) pro jedenkrát ionizované plazma v termodynamické rovnováze, která má tvar:

$$\frac{n_i^2}{n_n} = C \cdot T^{\frac{3}{2}} \cdot \exp\left(-\frac{U_i}{k \cdot T}\right), \quad (5)$$

kde  $C \approx 2,4 \cdot 10^{21} \text{ m}^{-3}$ ,  $n_i$  je koncentrace jednonásobných ionů,  $n_n$  je koncentrace neutrálních částic,  $U_i$  je ionizační potenciál (tj. energie, která musí být dodána jednomu atomu, aby došlo k ionizaci),  $k$  je Boltzmanova konstanta ( $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ ) a  $T$  je teplota plynu [35].

Plazma je podle ionizačního stupně děleno na slabě ionizované a silně ionizované. Ve slabě ionizovaném plazmatu je koncentrace nabitých částic na rozdíl od koncentrace neutrálních molekul zanedbatelně malá. Dochází zde tedy ke srážkám nabitých částic s neutrálními molekulami plynu. Energie vzájemného působení částic je dána polarizačními silami krátkého dosahu a potenciální energie klesá se vzdáleností částic  $r$  jako  $r^{-4}$ . Naopak v silně ionizovaném plazmatu dochází ke vzájemným srážkám mezi nabitými částicemi, tudíž zde převládá koncentrace nabitých částic nad koncentrací neutrálních molekul plynu. Důležitou roli zde hrají Coulombické síly dalekého dosahu, které udávají charakter silového působení mezi jednotlivými částicemi. V tomto případě klesá potenciální energie se vzdáleností  $r$  jako  $r^{-1}$  [38].

Dalším kritériem, podle kterého je možné plazma klasifikovat, je střední energie částic. Podle hodnoty střední energie částic v plazmatu je rozlišováno vysokoteplotní a nízkoteplotní plazma. Mezi tímto dělením neexistuje objektivní hranice, jedná se totiž o konvekční rozdělení. Pokud je střední energii nabitých částic větší než 100 eV, tedy teplota je vyšší než 1 MK, tak je zpravidla plazma označováno jako vysokoteplotní. Nízkoteplotním plazmatem je označováno plazma ve výbojích a plazma používané v plazmových technologiích, kde je hodnota střední energie elektronů vyšší než energie nabitých částic o větší velikosti. Tato hodnota střední energie elektronů se pohybuje v jednotkách až desítkách eV, čemuž odpovídá teplota řádově  $10^4$ – $10^5$  K [38].

### 2.6.2 Vlastnosti plazmatu

Plazma se od neutrálního plynu liší několika specifickými vlastnostmi. Jednou z těchto vlastností je schopnost plazmatu vést elektrický proud. Charakter této vlastnosti záleží na stupni ionizace plazmatu. V případě slabě ionizovaného plazmatu dochází k nárůstu elektrické vodivosti s rostoucí koncentrací nabitých částic. Pokud je hodnota koncentrace nabitých částic konstantní, tak elektrická vodivost klesá, ale zároveň dochází ke zvyšování teploty elektronů. Naproti tomu elektrická vodivost silně ionizovaného plazmatu nezávisí na koncentraci nabitých částic, ale je závislá na střední kinetické energii elektronů s exponentem 3/2. Elektrická vodivost je jednou z nejvýznamnějších fyzikálních vlastností plazmatu a způsobuje, že při vysokých teplotách může být plazma vodivější než kovové vodiče, proto je vhodné k použití v řadě různých technických aplikací [38].

Díky elektrické vodivosti působí na plazma také silné magnetické pole, jehož silové účinky jsou způsobeny tzv. Lorentzovou silou. Tato síla ovlivňuje volné elektrické náboje pohybující se v plazmatu a brání pohybu nabitých částic ve směru kolmém na magnetické siločáry. Tento jev je využíván při skladování vysokoteplotního plazmatu [38].

### 2.6.3 Typy plazmových výbojů

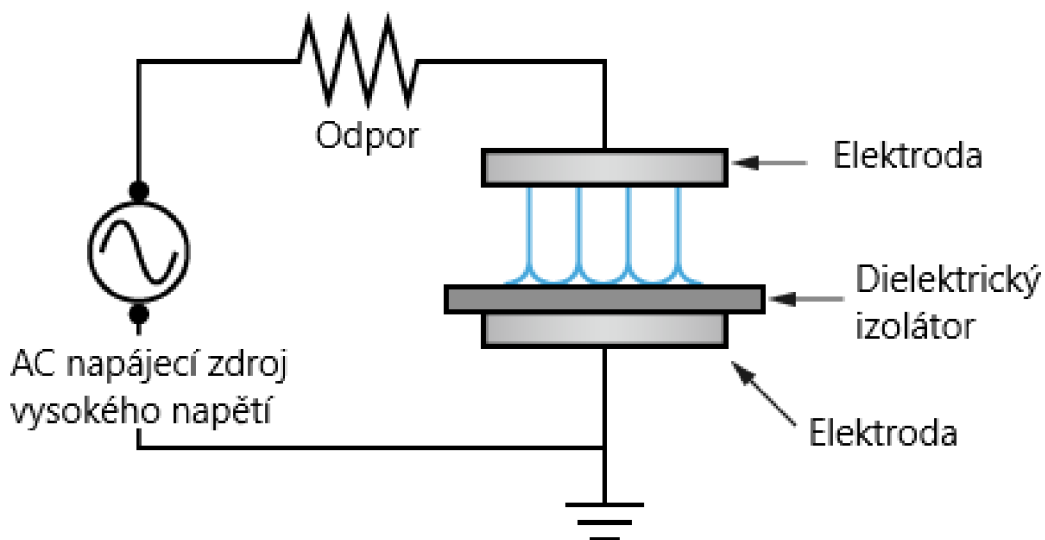
Plazma je nejčastěji generováno ionizačními procesy, které výrazně zvyšují stupeň ionizace nad jeho rovnovážnou hodnotu. Ionizaci lze uskutečnit hned několika způsoby, mezi které se řadí hlavně ionizace zářením, ionizace teplem, fotoionizace a ionizace elektrickým polem.

Ionizace zářením vzniká jako důsledek působení vysokoenergetického elektromagnetického záření, jako je například gama, beta nebo rentgenové záření. Tepelná ionizace je typem ionizace, který je způsoben vysokou teplotou. Při dostatečně vysoké teplotě získávají částice v plynném stavu dostatečnou energii k ionizaci. Tato ionizace se vyskytuje především ve hvězdách, právě díky vysokým teplotám na jejich povrchu. Fotoionizací je pak označován proces, při kterém jsou atom či molekula ionizovány zářením o určité vlnové délce, které představuje energii potřebnou k ionizaci. Fotoionizace vzniká ve vzduchu rentgenovými paprsky, zářením gama a UV zářením. Ionizace elektrickým polem je jedna z nejčastějších forem ionizace v laboratořích. Jejím základním mechanismem je interakce nabitých částic a elektrického pole. Při této interakci vzniká elektrický výboj. Prostřednictvím elektrického pole je nabitým částicím dodávána energie, která je transformována do jejich kinetické energie. Ke generaci plazmatu tímto způsobem je možné použít celou řadu různých druhů výbojů. Výboje se od sebe liší vlastnostmi i způsobem, kterým jsou vytvořeny a jsou individuálně přizpůsobovány konkrétním aplikacím. Tato kapitola shrnuje několik druhů základních a nejvíce používaných plazmových výbojů [37,39].

#### ***Dielektrický bariérový výboj***

Dielektrický bariérový výboj neboli DBD, je typ výboje založený na použití alespoň jedné dielektrické bariéry (např. skla, křemene, keramiky, slídy a oxidu hlinitého) ve výbojové mezeře s vysokým střídavým napětím aplikovaným na elektrody (viz Obrázek 3), což zabraňuje tvorbě jisker, eliminuje leptání a korozi elektrod a distribuuje výboj téměř rovnoměrně po celé ploše elektrody. Tento proces probíhá za atmosférického tlaku a díky použití vysokého napětí dochází k tvorbě intenzivního elektrického pole, které ionizuje plyn. V důsledku toho dochází ke generaci elektronů, metastabilních látek a tzv. *long life species* (viz kapitola 2.8). Napětí mezi dvojicí elektrod bývá v intervalu 1–100 kV a frekvence v rozsahu desítek kHz. Bariérové výboje lze rozdělit podle konfigurace elektrod a dielektrika na objemové (volume discharge – VD), povrchové (surface discharge – SD) a koplanární (coplanar discharge – CD) [40,41].

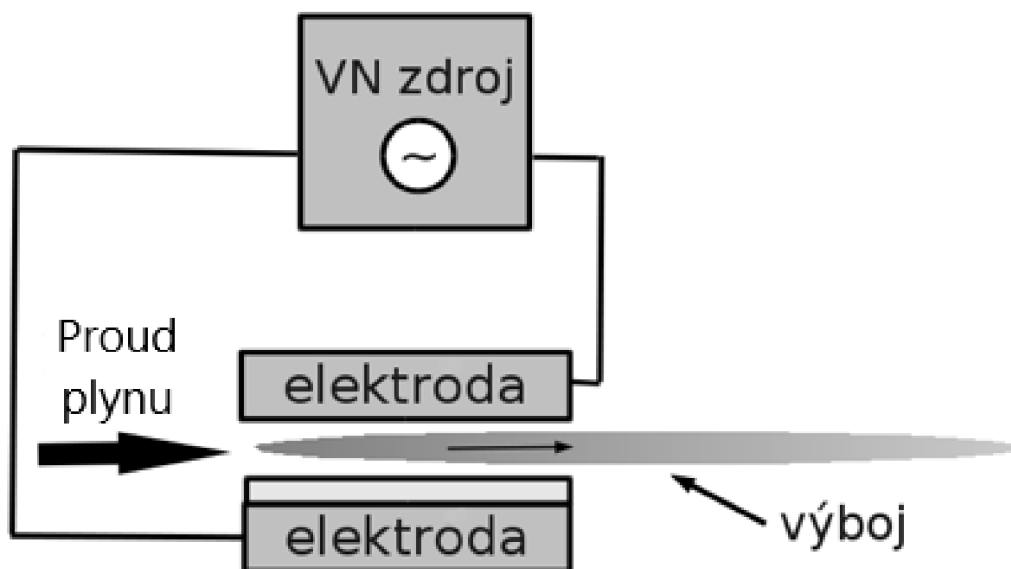




Obrázek 3: Dielektrický bariérový výboj [42]

### Plazmová tryska

Plazmová tryska neboli plasma jet, je složena ze dvou proti sobě postavených elektrod, mezi nimiž vzniká elektrický výboj podobný dielektrickému bariérovému výboji (viz Obrázek 4). Alternativou může být MW nebo RF rezonátor, na který je přiváděno vysoké napětí o vysoké frekvenci. Jako proudící plyn se používá atomární plyn (např. argon, helium), který strhává částice plazmy do prostoru, což vytváří dojem plamene. Plazmová tryska vytváří nízkoteplotní plazma, které má schopnost ničit patogenní mikroorganismy, dezinfikovat rány a urychlovat proces hojení a její hlavní výhoda spočívá v tom, že může být aplikována přímo na živou tkáň [43,44].



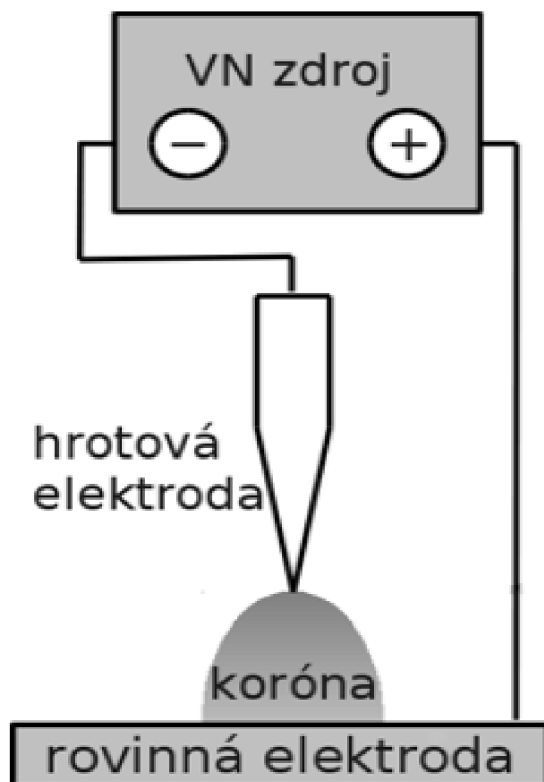
Obrázek 4: Plazmová tryska [43]

### ***Mikrovlnný výboj***

Mikrovlny jsou elektromagnetické vlny, jejichž frekvence (v řádech GHz) mnohonásobně převyšují frekvence radiofrekvenčních výbojů. Plazma generované pomocí mikrovln dosahuje vyšší elektronové hustoty než plazma získané pomocí stejnosměrných nebo vysokofrekvenčních výbojů. Díky této vysoké elektronové hustotě je plazma schopné dosáhnout také vyššího stupně disociace a ionizace. Mezi další vlastnost mikrovlnného výboje se řadí schopnost generace plazmatu v širokém rozmezí tlaků plynu, od atmosférického až po velmi nízké tlaky. Mikrovlnné výboje jsou využívány především k výrobě plynových laserů (např. CO<sub>2</sub> lasery), které přispívají ke zlepšování high-tech průmyslových odvětví, jako je optická litografie a *marking* [45].

### ***Korónový výboj***

Korónový výboj může být pozorován v nehomogenním elektrickém poli, které vzniká mezi dvěma elektrodami, z nichž alespoň jedna musí mít malý poloměr křivosti (tzv. hrotová elektroda nebo korunující elektroda) a vzniká, když se vzduch kolem vodiče ionizuje. Korónové výboje mají fialové zbarvení a používají se např. ke změně adhezních vlastností povrchů. Výboj vzniká aplikací vysokého napětí na malé hroty elektrod (viz Obrázek 5). Korónové výboje se také používají ke snížení odporu na rovném povrchu, dezinfekci bazénové vody, odstranění nežádoucích těkavých organických látek (včetně pesticidů a chemických látek) ze vzduchu. Korónové výboje představují neizotermický druh plazmatu, jehož teplota je relativně nízká, a tudíž šetrná k ošetřovaným povrchům [46].

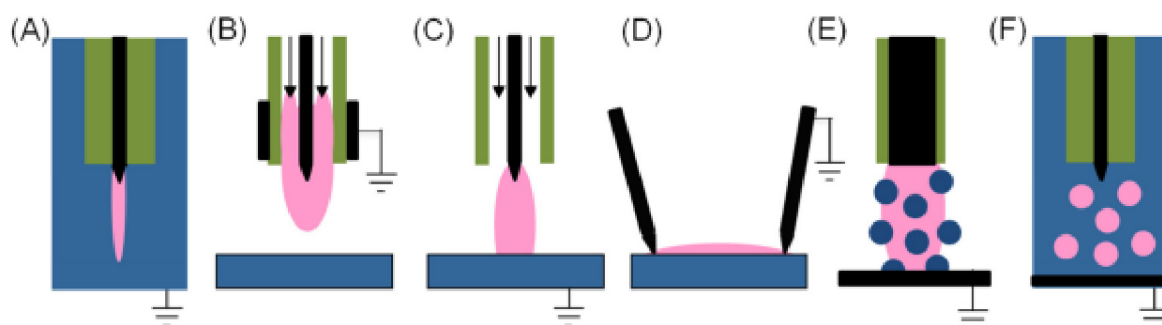


Obrázek 5: Korónový výboj [43]

## 2.7 Elektrické výboje v kontaktu s kapalinami

V průběhu posledních třiceti let se středem zájmu stala přímá interakce elektrických výbojů s kapalinami. To je možné realizovat pomocí elektrod v různých konfiguracích a rozdílným vstupním napětím. Bylo zjištěno, že klíčovou vlastností plazmatu je schopnost produkce chemicky aktivních látek a radikálů (tj. *reactive species*) a také UV záření. Plazma je skvělým přenašečem těchto částic ve vodě, což přispívá k velké rozmanitosti typů reakcí [47].

Interakce plazma-kapalina lze klasifikovat na základě způsobu generování výboje. Tento typ interakce je rozhodující, jelikož vysoce ovlivňuje vlastnosti plazmatu. Reaktory používané ke generaci výboje jsou znázorněny na Obrázku 6 a zpravidla jsou děleny dle typu konfigurace do tří kategorií: přímý výboj v kapalině, výboje v plynné fázi nad kapalinou, kde vodivá kapalina může být zároveň elektrodou a výboje ve vícefázovém prostředí, jako jsou výboje v bublinách uvnitř kapalin nebo výboje ve styku se spreji nebo pěnou [47].



Obrázek 6: Výboje generované při interakci plazma-kapalina: (A) výboj v kapalině, (B) plazma v plynné fázi bez kontaktu s kapalinou, (C) plynné plazma s tekutou elektrodou, (D) povrchový výboj, (E) plazma v plynné fázi s rozptýlenou kapalnou fází (aerosol), (F) výboje v bublinách [47]

### 2.7.1 Plynné plazma s tekutou elektrodou

Elektrické výboje v plynné fázi jsou zprostředkovávány pomocí impulsního výbojového reaktoru, který generuje elektrický výboj v plynu nad vodní hladinou a současně přímo v kapalině. Výboj v plynné fázi produkuje ozon, který se významně podílí na zvyšování oxidačních účinků výboje v kapalně fázi. Tyto výboje probíhají za atmosférického tlaku s využitím tekuté elektrody, která stabilizuje výboj, čímž zabraňuje kontrakci výboje na elektrodě [48,49].

### 2.7.2 Přímé elektrické výboje generované v kapalinách

Elektrické výboje generované v kapalinách (ve vodě, vodných roztocích apod.) se od výbojů generovaných v plynné fázi liší v několika aspektech. Výboje vznikající přímo v kapalině se vyznačují vyšší hustotou prostředí, která vede k větší srážkové frekvenci a nižší pohyblivosti nabitých částic. Taktéž se vyznačují vysokou dynamikou a vyžadují rychlé procesy ionizace a disociace, které jsou iniciovány elektrickým polem.

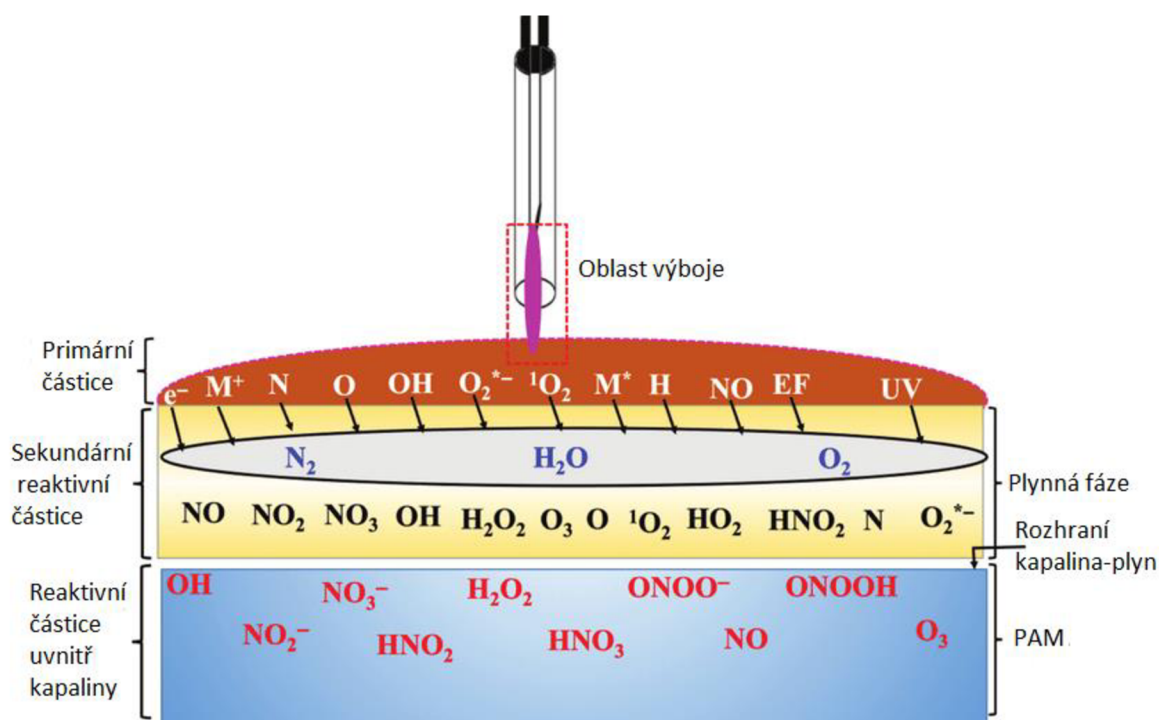
Prostřednictvím elektrických výbojů vzniká plazma, které se šíří v kapalině ve formě *streamerů* (výbojové kanálky, které se šíří mezi elektrodami). V těch posléze probíhá řada fyzikálních a chemických dějů, jako jsou silné UV záření a elektrické pole, rázové vlny a tvorba *reactive species* (tj. neutrální molekuly ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$ ), radikály ( $\bullet\text{OH}$ ,  $\bullet\text{H}$ ,  $\bullet\text{O}$ ,  $\bullet\text{HO}_2$ ) a ionty ( $\text{O}_2^-$ )) [37,47].

## 2.8 Plazmatem aktivovaná voda (PAW)

Plazmatem aktivovaná voda (*Plasma activated water*, PAW) je označení pro vodu, která byla vystavena působení nízkoteplotního plazmatu. Díky této interakci získává plazmatem aktivovaná voda silné antibakteriální a fungicidní vlastnosti, díky kterým se během posledních let stala velmi populární v oblastech životního prostředí, zemědělství, biomedicíny apod [50].

PAW se dá generovat dvěma hlavními způsoby. První možností je ošetření vody plazmatem generovaným přímo ve vodě anebo nepřímo produkty výboje unášenými iontovým větrem a difundujícími do vody probubláváním pracovního plynu. Druhý způsob je používaný častěji a spočívá v ošetření vody plazmatem generovaným v plynné fázi (vzduch, argon apod.) nad hladinou vody, tedy ošetřovaná voda je zároveň elektroda anebo je v přímém kontaktu s plazmatem generovaným např. plazmovou tryskou. Nejčastěji používané výboje pro generaci PAW byly podrobně popsány v kapitole 2.6.3 [47].

Při generování plazmatu nad vodním sloupcem dochází k transportu některých chemicky aktivních látek vytvořených v plynné fázi přes rozhraní plazma-kapalina do vodního sloupce (viz Obrázek 7). Těmito chemicky aktivními látkami jsou myšleny *reactive species*, které jsou děleny do dvou skupin v závislosti na délce jejich života. Krátkou dobu života mají tzv. *short live species* a jedná se především o radikály, mezi které se řadí radikál oxidu dusnatého ( $\bullet\text{NO}$ ), hydroxylový radikál ( $\bullet\text{OH}$ ) a superoxidový aniontový radikál ( $\bullet\text{O}_2^-$ ). Dále do této skupiny částic s krátkou dobou života patří atomární kyslík ( $\text{O}$ ), singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ), dusíkové ionty ( $\text{N}_2^+$ ) a excitované dusíkové molekuly ( $\text{N}_2^*$ ). Druhou skupinu tvoří částice s dlouhou dobou života, tzv. *long life species*. Hlavními zástupci této skupiny jsou peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), dusitany ( $\text{NO}_2^-$ ), dusičnany ( $\text{NO}_3^-$ ), ozón ( $\text{O}_3$ ), peroxyinitritový anion ( $\text{ONOO}^-$ ) a kyselina peroxyinitritová ( $\text{ONOOH}$ ). Tato skupina stabilních aktivních látek je zodpovědná za chemické a biologické účinky PAW. V neposlední řadě je také důležité zmínit, že charakter a množství těchto vznikajících aktivních látek závisí na typu plazmového napájení a na konfiguraci elektrod, dále také na výběru vhodného pracovního plynu a kapaliny a taktéž na délce působení výboje, kterému byla kapalina vystavena [51,52].



Obrázek 7: Série reakcí probíhajících na rozhraní plyn-kapalina během generace PAW [53]

## 2.9 Charakterizace PAW

Plazmatem aktivovaná voda vykazuje díky působení plazmatu odlišné chemické složení než běžná destilovaná nebo kohoutková voda, tudíž se liší i ve fyzikálních a chemických vlastnostech, které je tak nutné podrobně charakterizovat.

### 2.9.1 Stanovení pH

Hodnota pH vyjadřuje záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů v roztoku. Nabývá hodnot od 0 do 14. Chemicky čistá voda má při pokojové teplotě  $\text{pH} = 7$ , kyseliny  $\text{pH} < 7$  a zásady  $\text{pH} > 7$ . Na měření pH se můžou použít acidobazické indikátory, které indikují změnu pH změnou zbarvení. Mezi nejčastěji používané indikátory se řadí například thymolová modř, methylčerven nebo thymolftalein. Pro přesné měření hodnot pH vodných roztoků se v současné době používá převážně potenciometrie s využitím skleněné elektrody jako měrného článku. Podstatou metody je přesné měření elektrického potenciálu mezi měrnou (skleněnou) a referenční elektrodou. Jako referenční elektrody se nejčastěji uplatňují kalomelová nebo argentochloridová srovnávací elektroda [52,55,56].

Ošetření kapaliny plazmovým výbojem vede zpravidla k acidifikaci vody či vodného roztoku. Důvodem jsou reakce probíhající mezi chemicky aktivními látkami vznikajícími v plazmatu. Se zvyšující se dobou ošetření kapaliny dochází kvůli tvorbě silných kyselin ( $\text{HNO}_2$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HNO}_4$ ) k drastickému snižování hodnoty pH. Lze tedy říct, že hodnota pH PAW je ve většině případů nepřímo úměrná času aktivace kapaliny. Oehmigen a spol. [54] ve svém výzkumu uvádí, že dalším faktorem, který taktéž může mít vliv na snižování hodnoty pH, je peroxid vodíku generovaný plazmatem. Je dokázáno, že nízká hodnota pH je jedním z hlavních důvodů antimikrobiální aktivity PAW [52,55,56].

## 2.9.2 Stanovení měrné vodivosti

Vodivost je fyzikální veličina, která vyjadřuje schopnost roztoku vést elektrický proud. Jednotkou vodivosti je  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . K měření této veličiny se používá zařízení zvané konduktometr. Měření je odpor kapaliny mezi elektrodami vodivostní sondy ponořené do měřené kapaliny a k měření je využíváno střídavého proudu [57].

Měrná vodivost je považována za důležitý indikátor přítomnosti iontů v roztoku. Během ošetření vody plazmovým výbojem se vznikající chemicky aktivní látky a radikály snadno rozpouští ve vodě a výrazně tak mění vodivost roztoku. Thirumdas a spol. [52] ve své práci uvádí, že běžná hodnota vodivosti destilované vody se pohybuje v rozmezí hodnot 0,5–3  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Po aktivaci vody plazmovým výbojem může docházet ke zvýšení této hodnoty až na 500  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

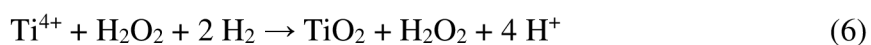
## 2.9.3 Stanovení redoxního potenciálu

Schopnost roztoku oxidovat nebo redukovat jinou látku je vyjadřována oxidačně-redukčním potenciálem (ORP), který je závislý na koncentraci oxidačních činidel a na jejich síle. Hlavní výhodou měření ORP vody je schopnost poskytnout rychlé hodnocení dezinfekčního potenciálu. Jedná se také o významný faktor ovlivňující mikrobiální inaktivaci. Dochází tak k narušení buněčné membrány mikroorganismů, čímž je vyvolán obranný mechanismus. Peroxid vodíku, řadící se mezi *reactive oxygen species* (ROS) vytvářené při aktivaci vody, je jedním z hlavních látek účastnících se redoxních reakcí. Jeho výhoda spočívá v tom, že se může chovat jako oxidační i jako redukční činidlo [52,56]. Shen [58] zkoumal ve své práci vliv doby a teploty skladování PAW na její ORP. Došel k závěru, že teplota skladování PAW nemá na hodnotu ORP téměř žádný vliv. Naopak při různých dobách skladování PAW docházelo ke změně hodnoty ORP. Z toho plyne, že ORP není závislý na teplotě skladování PAW, ale může být ovlivněn dobou skladování PAW.

## 2.9.4 Stanovení peroxidu vodíku

Peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) patří mezi ROS vytvářené při generaci PAW a významně ovlivňuje antimikrobiální vlastnosti PAW. Na  $\text{H}_2\text{O}_2$  je nahlíženo jako na ve vodě stabilní, konečný produkt, který má v závislosti na uchování a skladování PAW životnost řádově několik hodin až několik desítek dní. V kyselém prostředí hraje koncentrace  $\text{H}_2\text{O}_2$  spolu se superoxidovým aniontem důležitou roli při oxidačních vlastnostech PAW. Koncentrace  $\text{H}_2\text{O}_2$  je závislá na vodivosti vody po ukončení výboje [52].

Koncentrace peroxidu vodíku může být stanovena spektrofotometricky selektivní reakcí s využitím titanového činidla. Titanovým činidlem je označován síran titaničitý  $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ , který je rozpuštěn ve zředěné 27–31% kyselině sírové. Hlavní složkou činidla je titanylový iont, který selektivně reaguje s peroxidem vodíku dle rovnice (6) a tím dochází ke vzniku komplexu kyseliny peroxotitaničité. Vzniklý komplex má žluté zbarvení a jeho analýza se provádí spektrofotometricky při 407 nm [59].



### 2.9.5 Stanovení dusičnanů a dusitanů

Detekce dusitanových a dusičnanových iontů v PAW je hlavním důkazem tvorby *reactive nitrogen species* (RNS). Tyto ionty jsou zajímavé především pro své antibakteriální vlastnosti, které se projevují zejména v kyselém prostředí. Dále mohou být využívány taktéž jako alternativa organických hnojiv na podporu růstu rostlin, tudíž se staly velmi populárními v mnoha oblastech moderního zemědělství. Jako živiny jsou absorbovány rostlinnými enzymy (nitrátreduktáza) a dochází k jejich přeměně na dusíkaté sloučeniny a aminokyseliny. Jako signální molekuly také mohou řídit metabolismus a vývoj rostlin. Po ukončení plazmového výboje dochází k reakcím mezi vzniklými dusitanovými ionty a peroxidem vodíku, které vedou k tvorbě dusičnanů [52]. Burlica a spol. [60] sledovali ve svém výzkumu, jak se mění koncentrace dusičnanových a dusitanových iontů v závislosti na způsobu přípravy PAW. Došli k závěru, že koncentrace dusičnanů a dusitanů vytvářených v PAW připravené výbojem přímo v kapalině je o něco vyšší než koncentrace těchto iontů vytvářených v PAW připravené výbojem v plynné fázi nad hladinou kapaliny.

Dusitany jsou soli kyseliny dusité ( $\text{HNO}_2$ ), k jejichž stanovení se využívá Griessovo činidlo. Při Griessově reakci dochází k diazotaci kyseliny sulfanylové, kdy následně vzniklá diazoniová sůl reaguje s N-(1-naftyl)-ethylendiamin-dihydrochloridem v prostředí kyseliny octové. Griessovo činidlo reaguje s dusitanem za vzniku purpurového zbarvení azo produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při 543 nm [61].

Dusičnany jsou soli kyseliny dusičné ( $\text{HNO}_3$ ). Jedná se o ionty s dlouhou dobou života, tvoří se jako sekundární produkty a napomáhají antimikrobiální aktivitě při skladování. Stanovení dusičnanů je založeno na reakci se salicylanem sodným. Reakce probíhá v prostředí kyseliny sírové nebo trichloroctové. Produktem jsou žlutě zbarvené soli kyseliny nitrosalicylové, které se stanovují spektrofotometricky při 526 nm [62].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Působení plazmatem aktivované vody na bakterie

Je obecně známo, že pomocí přímého působení plazmové výboje lze díky vznikajícím radikálovým částicím velmi účinně eliminovat nežádoucí mikroorganismy. Použití samotného působení výboje má v praxi ale řadu omezení. Proto v poslední době přitahuje značnou pozornost široké vědecké společnosti plazmatem aktivovaná voda (PAW), tedy voda vystavená působení plazmového výboje. Ta si díky tzv. *long live species* – stabilním reaktivním částicím a formám dusíku a kyslíku vzniklým z radikálů – zachovává antimikrobiální vlastnosti po delší dobu a mohla by se stát účinným dezinfekčním prostředkem proti širokému spektru nejen bakterií, ale mikroorganismů obecně. PAW jako nový dezinfekční přípravek byla v několika studiích podrobena řadě *in vitro* testů, které zahrnovaly reprezentativní vzorky kmenů zástupců jak gramnegativních, tak grampozitivních bakterií.

Snížení bakteriální aktivity u gramnegativních a grampozitivních bakterií pomocí PAW zkoumali M. Ursache a spol. [63]. Jako zástupci gramnegativních bakterií byly vybrány bakterie *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella derby* a *Proteus vulgaris*, jako zástupci grampozitivních bakterií byli zvoleni *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus intermedius* a *Methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus*. Pro tuto srovnávací studii byla PAW vyrobena pomocí plazmového reaktoru s klouzavým obloukem. Destilovaná voda byla ošetřována plazmatem po dobu 10 minut. Zkoumané druhy bakterií byly vystaveny působení PAW celkově po dobu 60 minut. Inaktivované grampozitivní a gramnegativní bakterie byly vyjadřovány v jednotce log CFU pro časové intervaly 5, 15, 30, 45 a 60 minut. Snížení aktivity o 5 log CFU bylo považováno za ověřený antibakteriální účinek. Bylo zjištěno, že kmeny grampozitivních bakterií byly během procesu inaktivovány. Výjimkou byl kmen *Bacillus anthracis*, který vykazoval vyšší odolnost vůči PAW. Dále bylo zjištěno, že gramnegativní bakterie byly ve srovnání s grampozitivními bakteriemi citlivějšími na působení PAW. Důvod tohoto rozdílu spočívá v tom, že buněčná stěna grampozitivních bakterií je silnější (20–80 nm) než gramnegativních bakterií (10–15 nm). Buněčná stěna tudíž působila jako štít proti chemicky aktivním látkám a radikálům vytvořených v plazmových výbojích.

J. Shen a spol. [58] pracovali na studii, jejíž cílem bylo prozkoumat vliv skladování PAW při různých teplotách (25 °C, 4 °C, –20 °C, –80 °C) po dobu až 30 dnů na baktericidní účinky PAW a její fyzikálně-chemické vlastnosti. Pro experiment byly zvoleny grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*. K výrobě PAW byla použita plazmová tryska, kdy vzdálenost mezi koncem jetu a povrchem kapaliny byla 20 mm, přičemž destilovaná voda byla plazmatem ošetřována po dobu 20 minut. Bakterie byly kultivovány při 37 °C na živném médiu Luria-Bertani (LB). Po odstředění a resuspendování bakteriální suspenze v destilované vodě bylo 100 µl výsledné suspenze *S. aureus* přidáno do PAW temperované na 37 °C a inkubováno po dobu 20 min. Všechny experimenty byly provedeny ve třech opakováních. K hodnocení morfologie buněk před a po ošetření PAW byl použit rastrovací elektronový mikroskop.



Pro přípravu vzorku pro SEM byly buňky peletovány centrifugací a dehydratovány alkoholovým gradientem až do vysušení. Vzorky byly poté pozlaceny a pozorovány pod elektronovým mikroskopem. Výsledky ukázaly, že PAW skladovaná při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  poskytla nejlepší antibakteriální aktivitu proti *S. aureus*. Došlo ke snížení o 3–4 log během 30 dnů po vytvoření PAW. Naproti tomu PAW skladovaná při teplotách  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v daném pořadí poskytla pouze 0,2–2 log snížení životaschopnosti buněk po stejné době expozice a době skladování. Současně byly hodnoceny také fyzikálně-chemické vlastnosti PAW skladované při různých teplotách, a to její pH, oxidačně redukční potenciál (ORP) a koncentrace peroxidu vodíku, dusičnanů, dusitanů a NO radikálů. Z těchto výsledků vyplynulo, že bakteriální aktivita PAW skladované při teplotách  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  se časem snižovala a závisela na třech germicidních faktorech, konkrétně ORP,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{NO}_3^-$ .

Účinkem PAW jako dezinfekčního prostředku na gramnegativní bakterii *Escherichia coli* a grampozitivní bakterii *Listeria innocua* se zabývali ve své práci Q. Wang a D. Salvi [64]. Ve své studii zkoumali rovněž stabilitu PAW při skladování. Ke generaci PAW byla použita plazmová tryska pracující za atmosférického tlaku. Vzdálenost mezi koncem plazmové trysky a hladinou deionizované vody byla nastavena na 5 cm. Deionizovaná voda byla ošetřována plazmatem po dobu 1, 2, 3, 5, 10 nebo 15 min. Po ošetření byla PAW okamžitě převedena do centrifugační zkumavky a ponechána při pokojové teplotě. Bakteriální kultura byla pěstována přes noc při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby bylo dosaženo stacionární fáze v tryptickém sójovém médiu pro *E. coli* a Brain heart infusion médiu pro *L. innocua*. Kultury byly před použitím dvakrát centrifugovány, promyty a resuspendovány v deionizované vodě, aby byla získána počáteční bakteriální koncentrace přibližně  $10^8\text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Bakterie v planktonickém stavu byly přidány do centrifugační zkumavky obsahující PAW tak, aby bylo dosaženo koncentrace přibližně  $10^6\text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Směs byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 2 nebo 5 minut. Po každé inkubaci byla suspenze *E. coli* nebo *L. innocua* sériově zředěna v deionizované vodě a nanesena na tryptický sójový agar. Úbytek bakterií v  $\log\text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$  byl stanoven odečtením bakteriálních populací, které přežily ošetření plazmatem od bakteriální populace kontrolních vzorků. Pro vyhodnocení podmínek skladování byla PAW aktivována plazmatem po dobu 15 minut ( $\text{PAW}_{15}$ ) a byla následně skladovaná při pokojové teplotě ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) nebo v chladničce ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Následně došlo k analýze fyzikálně-chemických vlastností a inaktivační účinnosti proti *E. coli* a *L. innocua*. Doba skladování při obou teplotách byla až 48 hodin. Výsledky ukázaly, že účinnost PAW se zvýšila prodloužením doby aktivace deionizované vody plazmovou tryskou pro přípravu PAW nebo prodloužením inkubační doby bakterií v PAW. PAW aktivovaná plazmovou tryskou po dobu 5 minut zredukovala *E. coli* o více než  $10^5\text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$  a *L. innocua* o  $10^{1,8}\text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ , zatímco PAW aktivovaná plazmovou tryskou po dobu 15 minut zredukovala *E. coli* o více než  $10^5\text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$  a *L. innocua* o  $10^{3,5}\text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ . PAW tedy prokázala vyšší inaktivační účinnost proti gramnegativní *E. coli* než grampozitivní *L. innocua*, což naznačuje, že grampozitivní bakterie by mohly být odolnější vůči ošetření PAW. Nejvyšší účinnost inaktivace vykazovala čerstvě vyrobená PAW, zatímco PAW skladovaná v chladničce a PAW skladovaná při pokojové teplotě vykazovaly účinnost inaktivace pravděpodobně vlivem degradace reaktivních látek.

Další výzkum, který byl zaměřen na inaktivační účinky PAW na grampozitivní a gramnegativní bakterie v planktonním stavu, provedli Y. Zhao a spol. [65]. Jako reprezentativní bakteriální druhy byly vybrány grampozitivní *Listeria innocua* a *Staphylococcus aureus* a gramnegativní *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* a *Shewanella putrefaciens*. Bakterie byly nanášeny na tryptický sojový agar a inkubovány po dobu 24 hodin, aby byly získány izolované kolonie. PAW byla generována pomocí studené plazmové trysky pracujícího za atmosférického tlaku při 15, 22 a 30 kV po dobu 5 minut. Ihned po generaci byla každá bakteriální suspenze naočkována do PAW a byly měřeny počty životaschopných buněk při různých dobách expozice (0,5, 1, 3, 5 a 24 h) během skladování při 4 °C, aby se stanovila účinnost inaktivace. Následně byly provedeny snímky bakterií pomocí skenovacího elektronového mikroskopu, aby se prozkoumaly strukturní změny na buňkách studovaných bakterií. Taktéž byly stanovovány fyzikálně chemické vlastnosti PAW, včetně pH, vodivosti, ORP a koncentrace chemicky aktivních látek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Výsledky ukázaly, že účinnost inaktivace byla v pozitivní korelaci s napětím a dobou expozice. Gramnegativní bakterie byly k PAW citlivější než grampozitivní bakterie. Mezi dvěma zkoumanými grampozitivními bakteriemi vykazoval *S. aureus* mnohem větší odolnost vůči PAW než *L. innocua*. Taktéž bylo zjištěno, že různé reakce mohou záležet rovněž na tvaru bakterií. Všechny čtyři gramnegativní bakterie měly tvar tyčinky s podobnou velikostí kolem 2 μm. Nicméně *S. putrefaciens* a *P. fluorescens* byly významně náchylnější k PAW, což ukazuje, že na účinnost inaktivace mají vliv i jiné faktory, jako je například povaha buněčné membrány. U kontrolních vzorků bez ošetření PAW byly pozorovány hladké bakteriální povrchy, zatímco po ošetření PAW byly pozorovány u všech bakteriálních vzorků různé typy morfologického poškození, včetně drsného povrchu, smrštění nebo děr v buňce. Po ošetření plazmatem došlo u PAW k jejímu významnému okyselení, vodivost a ORP byly významně zvýšeny a obsah chemicky aktivních látek a radikálů byl detekovatelný po 48 hodinách.

### 3.2 Aplikace PAW v zemědělství

Nízká klíčivost semen mnoha rostlin je obvykle způsobena přítomností mikroorganismů a hub na povrchu semen. Tento problém může být také způsoben nesprávným způsobem hnojení a zavlažování. Z těchto důvodů se do popředí jako doplněk k tradičním metodám pro podporu růstu rostlin a snížení patogenní či chemické kontaminace semen dostává plazmatem aktivovaná voda. Při generaci PAW dochází ke vzniku reaktivních forem kyslíku a dusíku, které mohou mít důležitou roli v obranných reakcích rostlin. Účinek PAW na klíčení semen závisí na mnoha faktorech, jako jsou druh rostliny, doba aplikace, typ výboje, typ plazmového ošetření, chemické složení ošetřované vody, experimentální podmínky atd. V dnešní době se k hubení rostlinných bakteriálních patogenů využívá preventivních ošetření na bázi sloučenin mědi nebo antibiotik. PAW by tedy mohla představovat inovativní a alternativní nástroj pro kontrolu rostlinných chorob způsobených bakteriemi a jinými fytopatogeny [66].

L. Sivachandiranab a A. Khacef [66] studovali ve své práci vliv PAW generované pomocí dielektrického bariérového výboje (DBD) na zlepšení klíčení a růstu semen rajčat (*Solanum lycopersicum*), paprik (*Capsicum annum*) a ředkviček (*Raphanus sativus*). K výzkumu byly použity reaktory s dvojitou dielektrickou bariérou ve dvou různých konfiguracích, pro ošetření vody a ošetření semen. Jednalo se o válcový dvojitý DBD reaktor (Cyl-DBD), který byl použit pro výrobu PAW, kdy deionizovaná voda (DW) byla vystavena působení plazmatu po dobu 15 minut (PAW<sub>15</sub>) a 30 minut (PAW<sub>30</sub>). Dále se jednalo o deskový dvojitý DBD reaktor (PtP-DBD), který byl speciálně použit pro ošetřování semen plazmatem, kdy vzorky celkem 35 semen byly po 5 až 10 semenech umístěny na Petriho misky obsahujících vrstvy bavlny a došlo k rozdělení do tří skupin: semena ošetřovaná plazmatem 10 a 20 minut (P<sub>10</sub> a P<sub>20</sub>) a kontrola. Připravené vzorky byly zalévány 1 ml kohoutkové vody (TW), PAW<sub>15</sub> a PAW<sub>30</sub> v intervalu 24 hodin a umístěny do tmavé komory při teplotě 22 °C. Rychlost klíčení byla sledována během 3 až 6 dnů v závislosti na druhu semen. Pro studie růstu rostlin byla kontrolní a ošetřená semena zasazena do květináčů obsahujících 30 g půdního substrátu (kokosové vlákno, TRUFFAUT). Každý den bylo do kultivační půdy dodáváno 5 ml vody (TW, PAW<sub>15</sub> a PAW<sub>30</sub>). Rostliny byly pěstovány na světle, v izolované místnosti při teplotě 22 °C. Plynné látky na výstupu z obou plazmových reaktorů byly analyzovány online a kvantifikovány pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Byly stanovovány fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je pH a elektrická vodivost u TW, DW, PAW<sub>15</sub> a PAW<sub>30</sub>. Taktéž byla stanovována koncentrace dusitanů, dusičnanů, peroxidu vodíku a koncentrace ozonu. Výsledky ukázaly, že PAW zvýšila klíčivost semen ředkvičky o 80 % a zlepšila růst sazenic ve srovnání s TW. Pozitivní účinek na růst byl pozorován mezi plazmatem ošetřenými suchými semeny rajčat a paprik, které byly zalévány PAW ve srovnání s neošetřenými semeny za podobných experimentálních podmínek. Plazmové výboje na mokřích semenech však výrazně modifikovaly povrch semen a vykazovaly negativní vliv na proces klíčení semen. Bylo pozorováno, že doba ošetření semen plazmatem a doba ošetření PAW musí být optimalizována pro každý typ semen zvlášť.

S. Zhang a spol. [67] zkoumali vliv plazmatem aktivované vody (kohoutkové a demineralizované) a hnojiv na rychlost klíčení a rychlost prodlužování stonků čočky. Bylo použito komerčně dostupné kapalné hnojivo od společnosti Truffaut©, určené pro pokojové rostliny a používané podle doporučení dodavatele. Pro aktivaci vody a kapalného hnojiva byla použita plazmová tryska za atmosférického tlaku (APPJ). Po aktivaci byly kapaliny okamžitě aplikovány na semena nebo sazenice. Do 6 zkumavek bylo vloženo 20 semen čočky a ty byly zalévány postupně plazmatem aktivovanou kohoutkovou vodou, demineralizovanou vodou a tekutým hnojivem a ke všem vzorkům byly vytvořeny kontrolní, plazmatem neošetřené, vzorky. Semena byla denně zalévána řízenými objemy kapaliny tak, že ve dnech 1 a 2 se do každé zkumavky přidalo 10 ml kapaliny, aby byla všechna semena ponořena a následující den došlo k odstranění této kapaliny. Poté byl do každé zkumavky přidáván 1 ml kapaliny za den, aniž by byla kapalina následující den odstraněna. Experiment byl prováděn při teplotě 22,5 °C. Osvětlení bylo zajištěno okolním světlem a zesíleno po dobu 6 hodin denně pomocí zahradnického LED panelu. V průběhu experimentu byla také stanovována koncentrace dusičnanů a peroxidu vodíku v jednotlivých vzorcích.

Výzkumem bylo zjištěno, že u kontrolních vzorků má komerční hnojivo posilující účinek v raných fázích růstu sazenic, ale po čase se rychlost růstu vyrovná s rychlostí růstu sazenic zalévaných kohoutkovou vodou. Sazenice zalévané plazmatem aktivovanou kohoutkovou vodou vykazovaly během raných fází sazenic (6.–8. den) vysoký nárůst a 15. den dosahovaly hodnoty až 90 mm, tj. hodnoty nejméně čtyřikrát vyšší, než bylo dosaženo při použití kohoutkové vody nebo tekutého hnojiva u kontrolních vzorků. V tomto vzorku byly přítomny dusičnany v koncentracích až 500 mM a peroxid vodíku v koncentraci 150 mM. U sazenic zalévaných plazmatem aktivovaným hnojivem byl pozorován razantní nárůst v raných stádiích, ale později měl tento vzestup tendenci se zpomalovat, přičemž růst se zastavil na hodnotě 90 mm, tedy blízko hodnotě získané s použitím plazmatem aktivované kohoutkové vody. U vzorků s demineralizovanou vodou, ať už u kontrolních vzorků či u vzorků aktivovaných plazmatem bylo 15. den dosaženo rychlosti růstu přibližně 25 mm. Kohoutková voda a kapalná hnojiva vykazují podobné trendy, klíčivost je v obou případech nižší než 40 %, přičemž pokud jsou stejné tekutiny aktivovány plazmatem, tak dochází k nárůstu klíčivosti až téměř na 80 %. Překvapivě tento trend není pozorován u demineralizované vody, kde se dle získaných výsledků aktivace plazmatem dokonce snížila míru klíčení ze 71 % na 54 %.

Účinky ošetření plazmatem aktivovanou vodou ve vztahu k několika morfologickým, fyziologickým a biochemickým parametrům a také výnosu *Lactuca sativa* L. pěstovaného ve dvou různých objemech květináče (400 nebo 3 200 cm<sup>3</sup>) ve své studii zkoumali V. Stoleru a spol. [68]. PAW byla aplikována ve dvou koncentracích (1,5 a 3,0 mg · l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). PAW byla v tomto experimentu generována pomocí plazmového reaktoru. Technická funkce tohoto reaktoru spočívala v přímé expozici upravované vody elektrickému výboji v plazmové zóně. Semena klíčila za kontrolovaných podmínek v růstové komoře rostlin při teplotě 20 °C, 80% relativní vlhkosti a intenzitě osvětlení 1500 lx. Semena byla rozdělena do tří skupin: kontrolní (zalévaná destilovanou vodou), PAW I a PAW II. Výsledky ukázaly, že ošetření plazmatem nevedlo k významným rozdílům v rychlosti klíčení semen. Rozdíly mezi ošetřenými a neošetřenými semeny byly menší než 1 %. Pozitivní účinky ošetření byly zaznamenány na délce kořínků a hypokotylů salátu při koncentraci 1,5 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (PAW I). Taktéž byl výrazně zvýšen obsah chlorofylu při koncentraci 3,0 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (PAW II). U hmotnosti kořene, délky a šířky listů nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly mezi ošetřenými a neošetřenými rostlinami. Hmotnost sušiny byla významně vyšší u salátu ošetřeného PAW I a II pěstovaného ve velkoobjemových květináčích 57 dnů po přesazení a v maloobjemových květináčích 64 dnů po přesazení. Obsah dusitanů v salátu pěstovaném ve velkých květináčích byl nižší než v salátu pěstovaném v malých květináčích, a to bez ohledu na ošetření PAW. Naopak obsah dusičnanů byl vyšší u salátu pěstovaného ve velkých květináčích (až 36,4 mg KNO<sub>3</sub>/g sušiny) ve srovnání s malými květináči (pod 0,3 mg KNO<sub>3</sub>/g sušiny).

Ve výzkumu, který provedli A. Bertaccini a spol. [69] byly rostliny rajčat a vinné révy ošetřovány plazmatem aktivovanou vodou, aby se vyhodnotila její účinnost jako alternativního prostředku pro kontrolu chorob rostlin. Rostliny rajčat byly pěstovány ve skleníku a byly experimentálně naočkované fytopatogenem *Xanthomonas vesicatoria*, tedy bakterií, která způsobuje bakteriální skvrnitost listů na paprikách a rajčatech. Rostliny révy vinné byly pěstovány ve vinicích a infikované fytoplazmou, tedy bakterií, která je obligátním parazitem ve vodivém pletivu rostlin. Plazmatem aktivovaná voda byla vyrobena pomocí dielektrického bariérového výboje za atmosférického tlaku a aktivace trvala po dobu 10 minut. Antimikrobiální aktivita PAW *in vitro* byla testována pomocí difúzní a diluční metody. Při difúzní metodě bylo použito LB živné médium, na které byla naočkována bakteriální suspenze (přibližně  $10^7$  CFU·ml<sup>-1</sup>). Na disk s antibiogramem bylo následně přeneseno malé množství PAW. Vzorky byly poté inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 27 °C. Antibakteriální účinek byl vyhodnocen pomocí měření inhibiční oblasti a tento test byl opakován 3×. Při diluční metodě byla na LB živné médium naočkována bakteriální suspenze (přibližně  $10^8$  CFU·ml<sup>-1</sup>), k této suspenzi byla přidána PAW a následně probíhala inkubace při teplotě 25 °C po dobu 24 hodin při 80 ot·min<sup>-1</sup> v rotačním inkubátoru. Bakteriální populace každé zkumavky byla vyhodnocena po 24 hodinách inkubace odebráním 1 ml LB média. Každý vzorek byl desetkrát zředěn, nanesen a inkubován při 27 °C po dobu 48 h. Test byl opět opakován 3×. Rostliny rajčat *Moneymaker* a *VF 10* byly pěstovány jednotlivě v květináčích. Následně byly rostliny vyjmuty z květináčů a kořenový aparát byl ponořen na 10 minut do PAW, deionizované vody, která sloužila jako kontrola, a acibenzolar-S-methylu, který sloužil jako induktor rezistence. Inokulace byla provedena postřikem patogenu ve vodné suspenzi na povrchy listů. Rostliny rajčat byly poté přes noc uzavřeny v polyethylenových sáčcích. Hodnocení míry infekce se provádělo na 4 až 6 listech/rostlinu po uplynutí doby 21 dní od experimentální inokulace. Ošetření révy vinné pomocí PAW bylo provedeno na vybraných symptomatických a asymptomatických rostlinách, které byly předtím analyzovány na přítomnost fytoplazmy pomocí vnořených testů PCR/RFLP. Experimenty byly provedeny vstříknutím plazmatem aktivované nebo destilované vody do každé vybrané fytoplazmou infikované nebo fytoplazmou prosté rostliny révy vinné. Zbývající rostliny vinice byly použity jako neošetřená kontrola k ověření přirozeného chování choroby. K vstříkování kapalin do cévní tkáně rostliny byly použity speciálně upravené injekční stříkačky. Výsledky ukázaly, že PAW nevykazovala antimikrobiální aktivitu proti *Xanthomonas vesicatoria* ani v difúzních ani v dilučních testech *in vitro*. Tento výsledek mohl být ovlivněn časovým zpožděním (30 min), které způsobilo, že voda v okamžiku aplikace již neobsahovala žádné dusitany. Z výsledků *in planta* vyplývá, že ošetření PAW významně snížilo počet listových skvrn způsobených bakterií *Xanthomonas vesicatoria* v rostlinách rajčat *Moneymaker* a *VF 10*. U rostlin vinné révy v relevantním počtu případů vykazovaly infikované rostliny ošetřené PAW snížení symptomů a zvýšení produkce, zatímco rostliny ošetřené destilovanou vodou a neošetřené rostliny nevykazovaly žádné snížení symptomů. PCR/RFLP analýzy provedené na listech rostlin ošetřených PAW ukázaly snížení fytoplazmou napadených rostlin (62 %), které bylo pozorováno zároveň u rostlin ošetřených destilovanou vodou (33 %). U rostlin neinfikovaných fytoplazmou ošetřených PAW nebyla pozorována žádná fytotoxicita.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

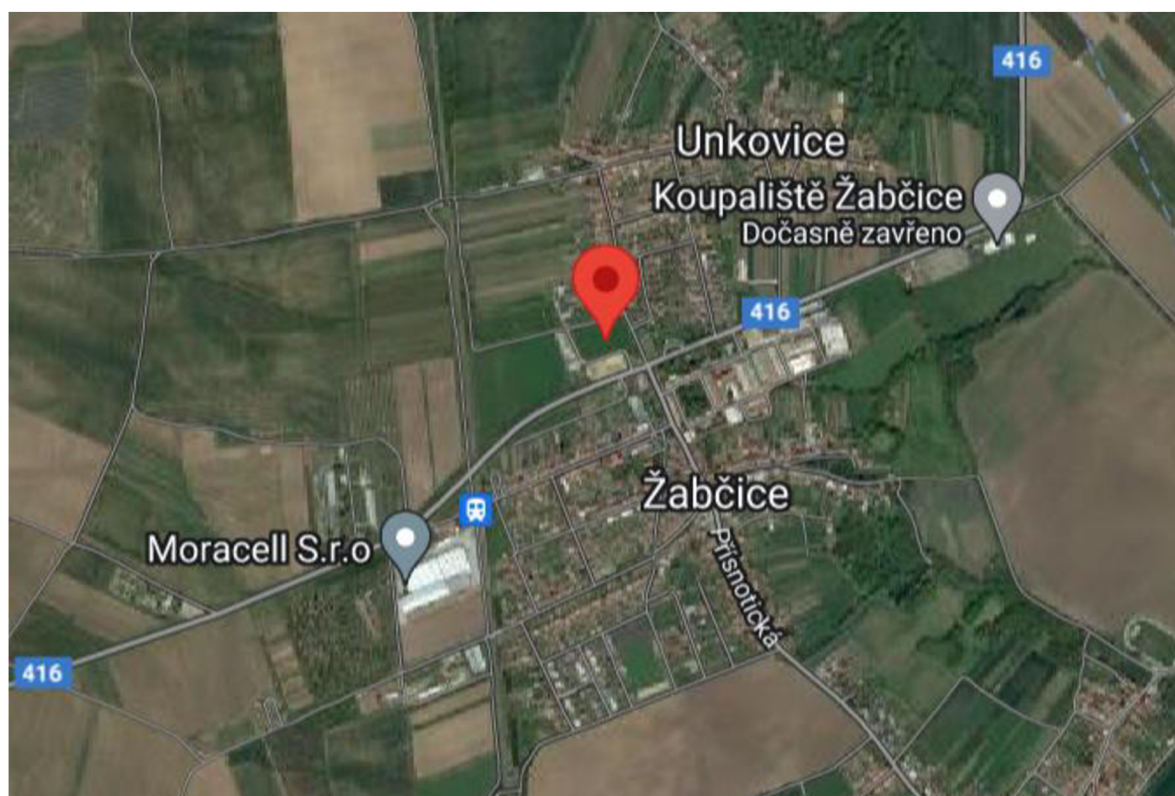
- dihydrogenfosforečnan draselný p.a., PENTA s.r.o., CAS 7778-77-0;
- síran hořečnatý heptahydrát p.a., PENTA s.r.o., CAS 10034-99-8;
- síran draselný čistý, PENTA s.r.o., CAS 7778-80-5;
- chlorid sodný p.a., PENTA s.r.o., CAS 7647-14-5;
- uhličitan vápenatý srážený p.a., PENTA s.r.o., CAS 471-34-1;
- agar, dáňish, Carl Roth GmbH + Co. KG, CAS 9002-18-0;
- D-mannitol; PENTA s.r.o., CAS 69-65-8;
- MQuent Nitrite Test 0,8 – 1,0 mg·l<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>;
- MColortest Nitrate Test 10 – 150 mg·l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>;
- titanové činidlo, Sigma-Aldrich, CAS 123334-00-9;
- peroxid vodíku 30% p.a., PENTA s.r.o., CAS 7722-84-1
- destilovaná voda, Laboratoř plazmových procesů FCH VUT;
- kyselina chlorovodíková 35% p.a, Lach-Ner, s.r.o., CAS 7647-01-0;
- 2,3,5-Triphenyltetrazolium chlorid, Carl Roth GmbH + Co. KG, CAS 298-96-4, čistota ≥98 %;
- Aceton, PENTA s.r.o., CAS 67-64-1;
- 1,3,5-Triphenyltetrazolium formazan, Sigma-Aldrich, CAS 531-52-2, čistota ≥90 %;
- tris(hydroxymethyl)aminomethan, PENTA s.r.o., CAS 77-86-1, čistota 99 %.

### 4.2 Použité přístroje

- CyberScan PC6500 pH metr s elektrodou, Eutech Instruments;
- UV/VIS spektrometr Unicam Helios Omega;
- reaktor budící DBD nad vodní hladinou, Laboratoř plazmových procesů FCH VUT;
- audiofrekvenční generátor, LIFETECH s.r.o.;
- spínací hodiny VIPONEL;
- analytické váhy SCALTEC SBC 41, Denver Instrument GmbH;
- ViparSpectra LED pěstební světlo.

### 4.3 Příprava nádobového pokusu

Hlavním předmětem daného výzkumu byly nádobové pokusy s modelovou rostlinou – *Lactuca sativa* (hlávkový salát). Vzorek půdy pro tento experiment byl odebrán z lokality Pohořelice v okrese Brno venkov (viz Obrázek 8). Podle půdní mapy [70] bylo zjištěno, že odebraným vzorkem půdy je černozem modální. Tento půdní typ vzniká na nezapevněných karbonátových substrátech, především na spraších a v hlubších částech tohoto půdního subtypu bývá přítomen kalcický horizont.



Obrázek 8: Lokalita odběru půdy ( $49^{\circ}00'54,0''N$ ;  $16^{\circ}35'56,4''E$ )

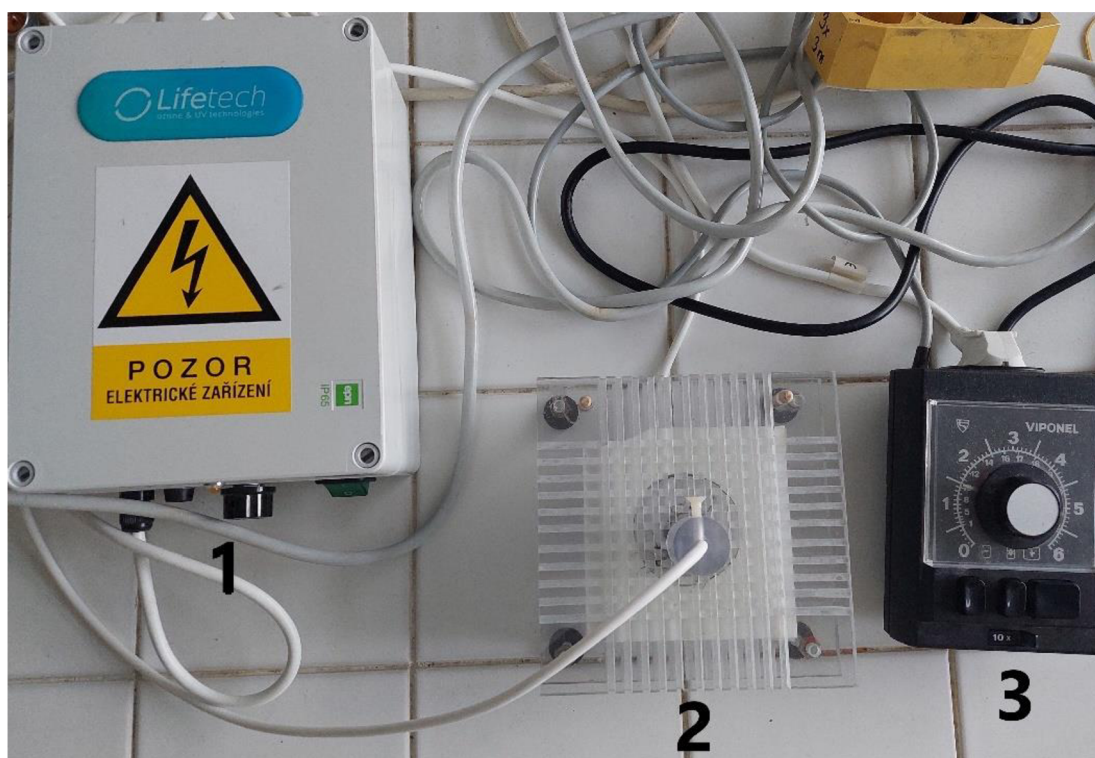
Odebraná půda byla sterilizována v autoklávu a proseta přes 2 mm síto. Navážka 1200 g proseté půdy byla nasypána do květináčů. Celkem bylo půdou naplněno 12 květináčů ( $13 \times 13 \times 13$  cm). Souběžně bylo do Petriho misky vyložené filtračním papírem nalito 15 ml kohoutkové vody. Na filtrační papír bylo naskládáno 20 semen hlávkového salátu a semena byla překryta druhým filtračním papírem. Takto připravená semena byla ponechána ke klíčení po dobu 5 dní na tmavém místě. Vyklíčená semena byla poté zasazena do květináčů. Květináče byly rozděleny do 4 skupin po 3 květináčích podle příslušné záливky. Každý květináč byl prolit 200 ml příslušné záливky, kterou představovala plazmatem aktivovaná voda vyrobená pomocí dielektrického bariérového výboje za střídavého proudu s dobou působení výboje 2 minuty (PAW<sub>2</sub>), 5 minut (PAW<sub>5</sub>) a 10 minut (PAW<sub>10</sub>) a destilovaná voda (DW). Květináče byly umístěny do growboxu, kde byly skladovány za neustálého přístupu umělého světla, nastaveného do režimu *vegetation*.

Prvním zalitím květináčů došlo k zahájení experimentu, který trval 90 dní. Během těchto 90 dní docházelo k postupné optimalizaci množství zálivek dle vegetačního stádia rostlin. Taktéž docházelo k pravidelné fyzikálně-chemické analýze zálivek. Spektrofotometricky byly stanovovány koncentrace peroxidu vodíku, dusitanových a dusičnanových iontů a taktéž bylo měřeno pH a vodivost zálivek.

#### 4.4 Příprava PAW

Plazmatem aktivovaná voda byla pro potřeby experimentu připravována pomocí dielektrického bariérového výboje s kapalnou elektrodou. Tento systém pro výrobu PAW byl vyroben v laboratoři plazmových procesů na Fakultě chemické VUT v Brně. Součástí systému zobrazeného na Obrázku 9 je Petriho miska (průměr 90 mm a objem 75 ml), na jejíž dno je z vnější strany nanášena grafitová elektroda (průměr 50 mm).

Víko reaktoru je vyhotoveno z korundové keramiky ( $102 \times 102 \text{ mm}^2$ ) a z vnější strany je ve středu napařena stříbrná elektroda (průměr 50 mm). Obě elektrody jsou připojeny k audiofrekvenčnímu generátoru (frekvence 11 Hz a napětí 16 kV) vyrobenému na zakázku. Z elektrické sítě je dodávána celková energie ( $36 \pm 2$ ) W. Poslední částí systému pro přípravu PAW jsou spínací hodiny, které jsou potřebné k zajištění přesného času ošetření kapaliny. PAW byla připravována nalitím 75 ml destilované vody do Petriho misky, která byla následně přikryta horní částí reaktoru s elektrodou, a poté byl zapnut generátor. Elektrický výboj hořel za atmosférického tlaku mezi korundovou keramikou a povrchem vody v Petriho misce, přičemž byl po každých patnácti sekundách přerušován, aby došlo k zabránění nadbytečné tvorby ozonu a  $\text{NO}_x$ . Pro účely práce byla připravena PAW s dobou trvání výboje 2, 5 a 10 minut.



Obrázek 9: Systém pro přípravu PAW: (1) vysokofrekvenční zdroj napětí, (2) DBD reaktor, (3) spínací hodiny



## 4.5 Fyzikální a chemická charakterizace PAW

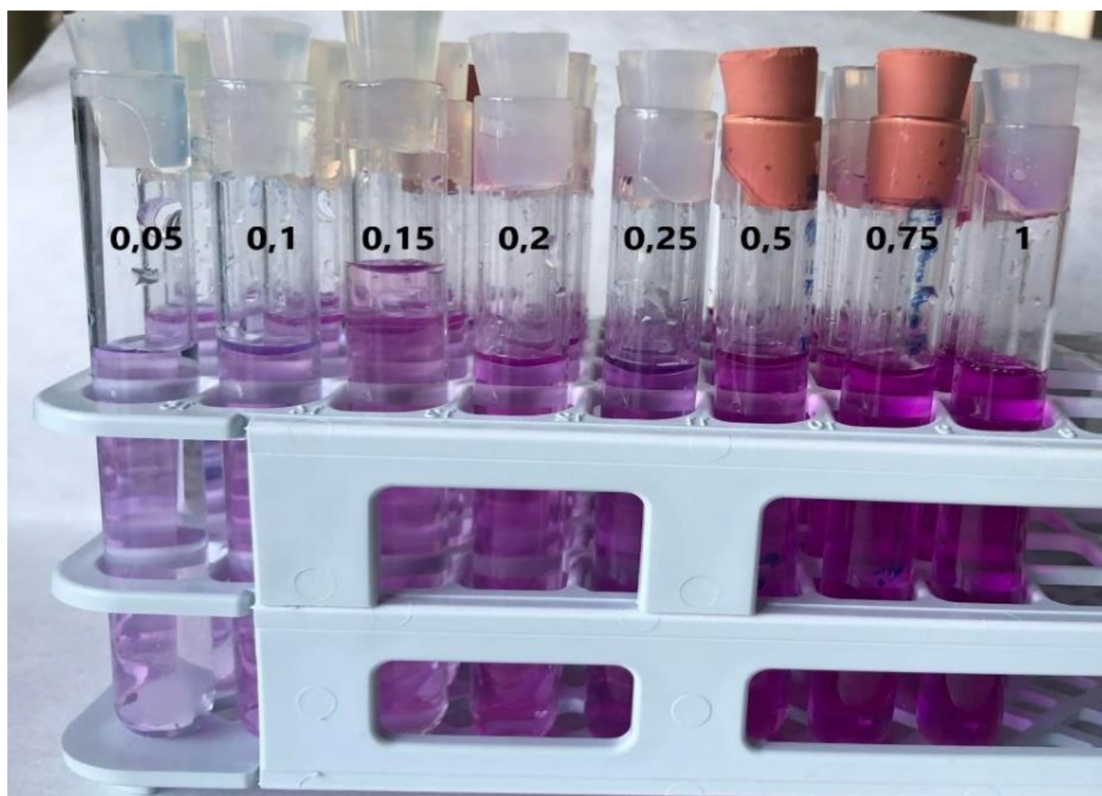
Ihned po přípravě plazmatem aktivované vody byly stanoveny její fyzikálně-chemické vlastnosti. Součástí charakterizace bylo měření pH a vodivosti připraveného roztoku. Dále byla spektrofotometricky stanovována koncentrace peroxidu vodíku, dusitanů a dusičnanů.

### 4.5.1 Spektrofotometrické stanovení dusitanů

Nejprve bylo třeba připravit kalibrační křivku. Za tímto účelem byla připravena koncentrační řada roztoků  $\text{NO}_2^-$  v rozmezí koncentrací  $0,05\text{--}1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Na analytických vahách bylo naváženo množství  $0,1500\text{ mg}$   $\text{NaNO}_2$ . Tato navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky a doplněna na objem  $1000\text{ ml}$  destilovanou vodou. Z tohoto zásobního roztoku byly dalším ředěním destilovanou vodou připraveny roztoky  $\text{NO}_2^-$  o požadované koncentraci podle Tabulky 1. K vytvořeným roztokům byla ve zkumavkách přidána jedna odměrka komerčního činidla (MQuent Nitrite Test) a roztok byl ve zkumavce důkladně protřepán. U kalibrační řady roztoků  $\text{NO}_2^-$  bylo pozorováno charakteristické purpurové zbarvení viditelné na Obrázku 10. Hodnoty absorbance koncentrační řady roztoků byly měřeny spektrofotometricky při vlnové délce  $543\text{ nm}$ , která odpovídá absorpčnímu maximu dusitanů. Referenčním vzorkem byla destilovaná voda. Pro jednotlivé roztoky byly odečtené hodnoty absorbancí vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci roztoků.

Tabulka 1: Kalibrační řada roztoků  $\text{NO}_2^-$

$c(\text{NO}_2^-)$ [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	V [ml]
0,05	0,025
0,10	0,050
0,15	0,075
0,20	0,100
0,25	0,125
0,50	0,250
0,75	0,375
1,00	0,500



Obrázek 10: Kalibrační roztoky  $\text{NO}_2^-$  v rozmezí koncentrací  $0,05\text{--}1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

#### 4.5.2 Spektrofotometrické stanovení dusičnanů

Pro stanovení kalibrační křivky dusičnanů byla připravena koncentrační řada roztoků  $\text{NO}_3^-$  v rozmezí koncentrací  $10\text{--}100\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Na analytických vahách bylo naváženo množství  $0,1600\text{ mg}$   $\text{KNO}_3$  a tato navážka byla kvantitativně převedena odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou na objem  $1000\text{ ml}$ . Ze zásobního roztoku byly podle Tabulky 2 ředěním destilovanou vodou vytvořeny roztoky  $\text{NO}_3^-$  o různých koncentracích. Roztoky byly smíchány ve zkumavkách se dvěma odměrkami komerčního činidla (MColorTest Nitrate Test) a důkladně protřepány. Vzniklá koncentrační řada roztoků se zbarvila do charakteristické slabě hnědé barvy. Dusičnanové ionty byly následně stanovovány pomocí UV-VIS spektroskopie. Referenčním vzorkem byla destilovaná voda a měření probíhalo při vlnové délce  $380\text{ nm}$ . Pro jednotlivé koncentrace vzorků byly odečteny hodnoty absorbancí, které byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci.

Tabulka 2: Kalibrační řada roztoků  $\text{NO}_3^-$

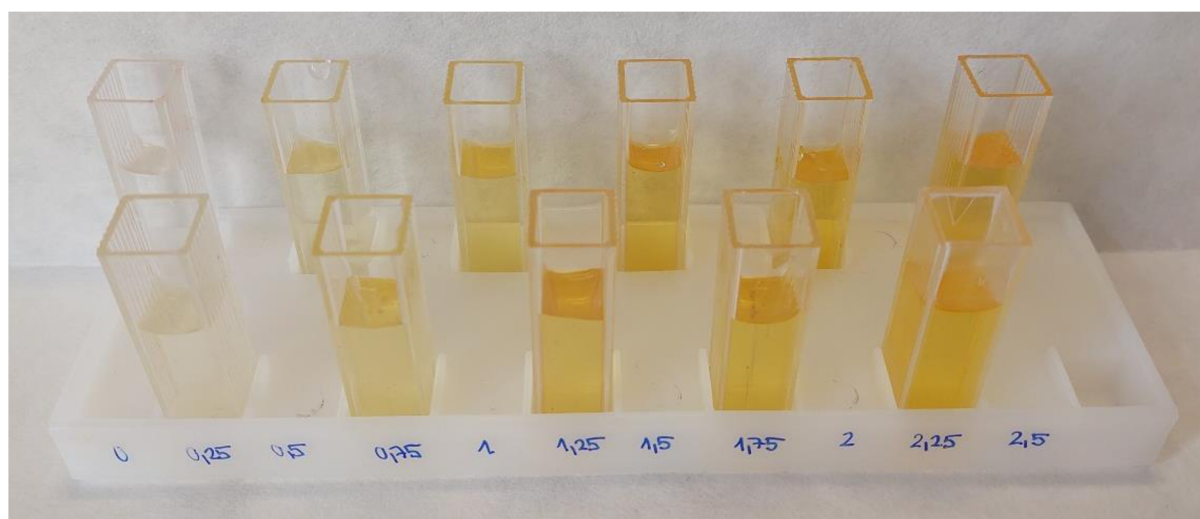
$c(\text{NO}_3^-)$ [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	V [ml]
10,0	5,00
12,5	6,25
25,0	12,50
37,5	18,75
50,0	25,00
75,0	37,50
100,0	50,00

### 4.5.3 Spektrofotometrické stanovení peroxidu vodíku

Nejprve bylo potřeba připravit koncentrační řadu roztoků peroxidu vodíku v destilované vodě v rozmezí koncentrací 0–2,5 mmol·l<sup>-1</sup>. K tomuto účelu byl použit 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o hustotě 1,11 g·cm<sup>-3</sup> a molární hmotnosti 34,01 g·mol<sup>-1</sup>. Zásobní roztok byl připraven naředěním 0,5 ml peroxidu vodíku destilovanou vodou. Následně byly ze zásobního roztoku připraveny roztoky peroxidu vodíku o různých koncentracích ředěním destilovanou vodou podle Tabulky 3. Tyto roztoky byly poté smíchány ve zkumavkách s titanovým činidlem v poměru 2 ml roztoku ku 1 ml titanového činidla. U kalibrační řady roztoků H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bylo pozorováno charakteristické žluté zbarvení viditelné na Obrázku 11. Absorbance připravených roztoků byla proměřena spektrofotometricky při vlnové délce 407 nm proti referenčnímu vzorku, kterým byla destilovaná voda s titanovým činidlem. Pro jednotlivé roztoky byly odečteny hodnoty absorbancí, které byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci roztoků.

Tabulka 3: Kalibrační řada roztoků H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) [mmol·l <sup>-1</sup> ]	V [ml]
0,25	0,26
0,50	0,51
0,75	0,77
1,00	1,02
1,25	1,28
1,50	1,53
1,75	1,79
2,00	2,04
2,25	2,30
2,50	2,55



Obrázek 11: Kalibrační roztoky peroxidu vodíku v rozmezí koncentrací 0–2,5 mmol·l<sup>-1</sup>

## 4.6 Stanovení půdní enzymatické aktivity

Ke zjištění celkové půdní mikrobiální aktivity bylo prováděno stanovení aktivity enzymu dehydrogenázy v odebraných půdních vzorcích podle normy ISO 23753-1 [71].

### 4.6.1 Spektrofotometrické stanovení 1,3,5-Triphenyltetrazolium formazanu (TPF)

#### *Příprava roztoku kyseliny chlorovodíkové*

K přípravě 1M roztoku HCl byla použita kyselina chlorovodíková 35%. Do 50 ml odměrné baňky bylo napipetováno 4,3 ml 35% HCl a objem baňky byl doplněn destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl následně připraven k použití pro úpravu pH tris pufrového roztoku.

#### *Příprava tris pufrového roztoku*

Navážka 12,112 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu byla rozpuštěna v 600 ml destilované vody. Pomocí 1M kyseliny chlorovodíkové bylo upraveno pH roztoku podle hodnoty pH půdy dle Tabulky 4 na výslednou hodnotu pH 7,4. Následně byl roztok v odměrné baňce doplněn po rysku destilovanou vodou na objem 1000 ml.

Tabulka 4: Úprava pH tris pufru

pH půdy	pH roztoku
<6	7,8
6–7	7,6
>7	7,4

#### *Příprava roztoku 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloridu (TTC)*

Cílem bylo připravit 1% roztok TTC. Koncentrace výsledného roztoku byla stanovena podle Tabulky 5, která uvádí závislost koncentrace roztoku na kvalitě půdy (tj. obsah humusu a jílu v půdě). K přípravě roztoku byla navážka 2,018 g TTC rozpuštěna ve 200 ml dříve připraveného tris pufru.

Tabulka 5: Závislost koncentrace roztoku TTC na kvalitě půdy

Kvalita půdy	Koncentrace roztoku TTC
Písčítá, mírně humická půda	0,1–0,5 %
Hlinitá, humická půda	0,1–1 %
Jílovitá, huminová půda	1–2 %

#### *Příprava kalibračních roztoků TPF*

Ke stanovení kalibračních roztoků TPF v rozmezí koncentrací 0–33  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  bylo nejprve potřeba připravit zásobní roztok. Navážka 1,0118 g TPF o molární hmotnosti 300,36  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  byla kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna po rysku acetonem. Z tohoto zásobního roztoku byl poté připraven pracovní roztok TPF. Do 100 ml odměrné baňky byl napipetován 1 ml zásobního roztoku a opět byla baňka doplněna acetonem po rysku. Kalibrační roztoky TPF byly připravovány z pracovního roztoku ředěním acetonem podle Tabulky 6.

U kalibrační řady roztoků TPF bylo pozorováno charakteristické rudé zbarvení viditelné na Obrázku 12. Jelikož na světle dochází k rozkladu TPF, bylo nutné uchovávat roztoky po celou dobu přípravy v tmavém prostředí.

Tabulka 6: Kalibrační řada roztoků TPF

CTPF [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	V <sub>pracovní roztok</sub> [ml]
3,3	1,65
6,67	3,3
16,7	8,3
33	16,5



Obrázek 12: Kalibrační roztoky TPF v rozmezí koncentrací 3,3–33  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (foto bylo pořízeno po ukončení měření z důvodu nestability roztoků na světle)

### **Stanovení DHA ve vzorcích půdy**

Do 4 zkumavek byla převedena navážka 5 g přirozeně vlhké půdy z jednoho květináče, přičemž do tří zkumavek bylo přidáno 5 ml roztoku TTC a do poslední zkumavky bylo přidáno 5 ml tris pufru, který sloužil jako slepý vzorek.

Tento postup byl opakován pro všechny květináče čili celkem bylo tímto způsobem připraveno 48 zkumavek. Tyto zkumavky byly pořádně protřepány a ponechány k inkubaci po dobu 16 hodin při pokojové teplotě. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 25 ml acetonu. Takto připravené vzorky byly ponechány ve tmě po dobu jedné hodiny, následně byly všechny zkumavky protřepány a opět ponechány po dobu jedné hodiny ve tmě. Po uplynutí druhé hodiny došlo opět k protřepání vzorků a následovala jejich filtrace přes skládaný filtr. Vzorky a jejich charakteristické zbarvení lze vidět na Obrázku 13.

Ihned po filtraci byly vzorky měřeny na spektrofotometru při vlnové délce 485 nm proti referenci acetonu. Aktivita dehydrogenázy v jednotkách  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  byla stanovena prostřednictvím rovnice (7) upravené dle Casida [34]:

$$a = \frac{c_{TPF} \cdot V \cdot 100}{m \cdot DM \cdot t}, \quad (7)$$

kde  $c_{TPF}$  je koncentrace TPF odečtená z kalibrační křivky v  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $V$  je celkový objem roztoku (TRIS/TTC + AcON) v ml,  $m$  je počáteční hmotnost vzorku půdy v g,  $DM$  představuje vlhkost půdy v % a  $t$  dobu inkubace.



Obrázek 13: Charakteristické zbarvení roztoků po přidání acetonu (květináč č. I., zálivka PAW<sub>10</sub>)

## 4.7 Stanovení počtu dusík poutajících mikroorganismů v půdě

Po uplynutí doby trvání experimentu byl stanovován půdní mikrobiom v odebraných vzorcích půdy, konkrétně se zaměřením na bakterie fixující dusík (*Rhizobium* spp. a *Azotobacter* spp.). Stanovení přítomnosti půdních mikroorganismů a jejich kvantifikace bylo prováděno pomocí tzv. zředovací metody [72] na živné půdě specifické pro stanovení dusíkatých bakterií (Ashbyho agar).

### 4.7.1 Příprava kultivačního média

K izolaci druhů *Azotobacter* (*Azotobacter nigricans* ATCC 35009, *Azotobacter vinelandii* ATCC 478) z půdy byl vybrán Ashbyho mannitolový agar. Médium obsahuje mannitol, který tyto bakterie využívají jako zdroj uhlíku. Příprava tohoto média se řídila Tabulkou 7, kde je uveden obsah potřebných chemikálií na výrobu 1000 ml média. Pro lepší viditelnost N-bakterií bylo do kultivačního média přidáno přírodní červené potravinářské barvivo.

Hodnota pH připraveného média byla 7,4. Sterilizace následně proběhla v tlakovém hrnci při teplotě 121 °C po dobu 30 minut. Sterilizované médium bylo nalito po 10 ml do Petriho misek a ponecháno ke ztuhnutí.

Tabulka 7: Složení Ashbyho mannitolového agaru

Chemikálie	Obsah [g·l <sup>-1</sup> ]
Mannitol	20,0
Dihydrogenfosforečnan draselný	0,2
Síran hořečnatý	0,2
Chlorid sodný	0,2
Síran draselný	0,1
Uhlíčan vápenatý	5,0
Agar	15,0

#### 4.7.2 Příprava suspenzí

5 g půdy z každého květináče bylo smícháno v reagenční lahvi se 45 ml sterilní vody. Celkem bylo takto vytvořeno 12 suspenzí: DW (I., II., III.), PAW<sub>2</sub> (I., II., III.), PAW<sub>5</sub> (I., II., III.), PAW<sub>10</sub> (I., II., III.). Reagenční lahve se suspenzemi byly ponechány na třepačce po dobu 60 minut a po uplynutí této doby byly ponechány 30 minut k sedimentaci. Z důvodu nevyhodnotitelných výsledků byl následující týden experiment opakován s tím rozdílem, že reagenční lahve se suspenzemi byly na třepačce ponechány ke kultivaci po dobu 7 dní.

#### 4.7.3 Ředění a očkování suspenzí

Ze základních suspenzí byla připravena řada desetinásobných ředění postupným pipetováním 100 µl suspenze do připravených zkumavek s 4900 µl sterilní destilované vody. Ředící řada byla připravena do čtvrtého ředění ( $1 \cdot 10^{-1}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$  (2×),  $1 \cdot 10^{-4}$ ). Do sterilních Petriho misek vylitých kultivačním médiem bylo očkováno 100 µl z každého ředění. Po naočkování byly Petriho misky uloženy ke kultivaci do termostatu při teplotě 28 °C po dobu 5 dní. Všechny Petriho misky byly po 5 dnech nafoceny a ručně byly spočítány vyrostlé bakteriální kolonie.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Charakterizace PAW

Jedním z úkolů praktické části této diplomové práce bylo zkoumat vliv PAW připravené pomocí dielektrického bariérového výboje na půdní enzymatickou aktivitu v souvislosti s obsahem chemicky aktivních látek s dlouhou dobou života, tzv. *long life species*, které vznikají při její přípravě. Pro tyto účely bylo potřeba provést fyzikálně-chemickou charakterizaci vybraných vlastností připravené PAW, díky níž jsou poskytnuty důležité informace o vlastnostech PAW, které jsou zásadní pro její správné použití a účinnost v různých aplikacích.

Důležitým krokem pro zajištění přesnosti a spolehlivosti analýzy bylo sestavení kalibračních křivek pro stanovení dusitanů, dusičnanů a peroxidu vodíku. Postup pro sestavení kalibračních křivek je popsán v kapitole 4.5. Kalibrační roztoky dusitanových iontů byly měřeny pomocí spektrofotometru při vlnové délce  $\lambda = 543$  nm, jež odpovídá absorpčnímu maximu dusitanů. Referenčním vzorkem byla destilovaná voda a k měření byla použita plastová kyveta. K proměření kalibračních roztoků dusičnanových iontů byla použita křemenná kyveta. Referenčním vzorkem byla destilovaná voda a měření probíhalo při vlnové délce  $\lambda = 380$  nm. V poslední řadě byla měřena absorbance připravených kalibračních roztoků peroxidu vodíku při vlnové délce  $\lambda = 407$  nm proti referenčnímu vzorku, kterým byla destilovaná voda s titanovým činidlem. K měření byla použita plastová kyveta.

Po proměření všech kalibračních roztoků byly získané hodnoty absorbancí vyneseny do grafů v závislosti na koncentraci kalibračních roztoků. Ze sestavených kalibračních křivek, zobrazených na Obrázcích 14, 15, 16 byly získány rovnice pro stanovení koncentrace aktivních látek v roztocích, které mají tvar:

$$A = 0,9311 \cdot c_{NO_2^-} \quad (8)$$

kde  $A$  představuje absorbanci roztoku a  $c$  koncentraci  $NO_2^-$  ve vzorku v  $mg \cdot l^{-1}$ ,

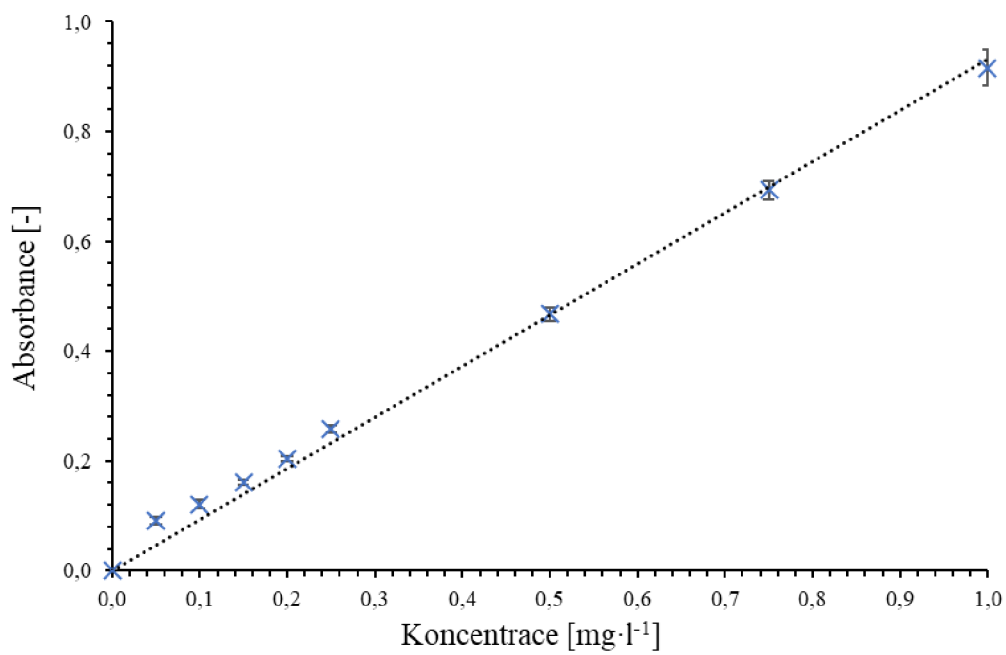
$$A = 0,0196 \cdot c_{NO_3^-} \quad (9)$$

kde  $A$  představuje absorbanci roztoku a  $c$  koncentraci  $NO_3^-$  ve vzorku v  $mg \cdot l^{-1}$ ,

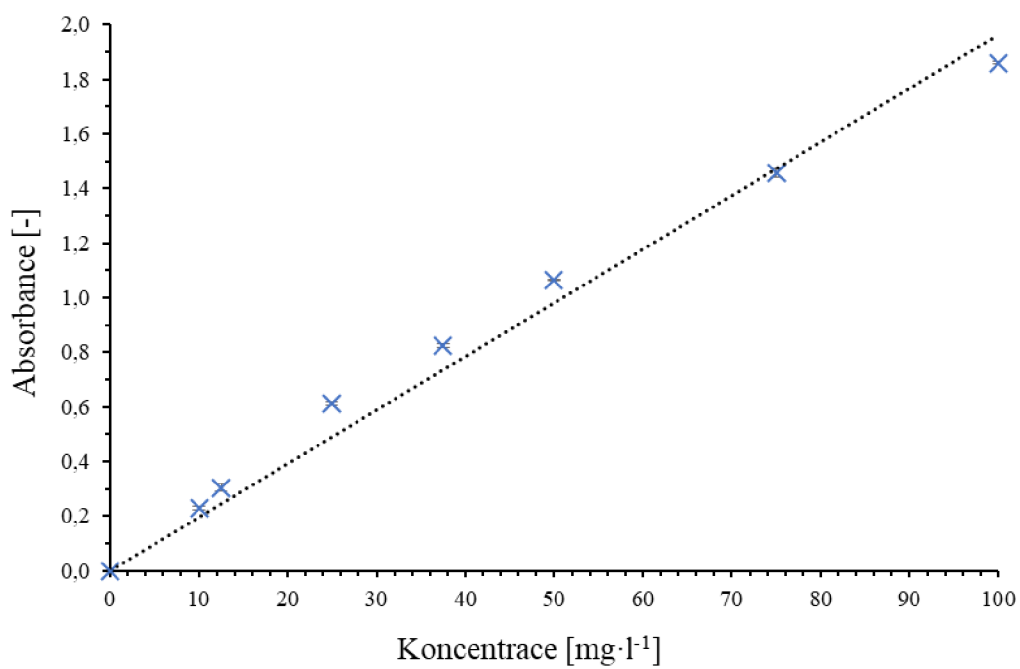
$$A = 0,4560 \cdot c_{H_2O_2} \quad (10)$$

kde  $A$  představuje absorbanci roztoku a  $c$  koncentraci  $H_2O_2$  ve vzorku v  $mmol \cdot l^{-1}$ .

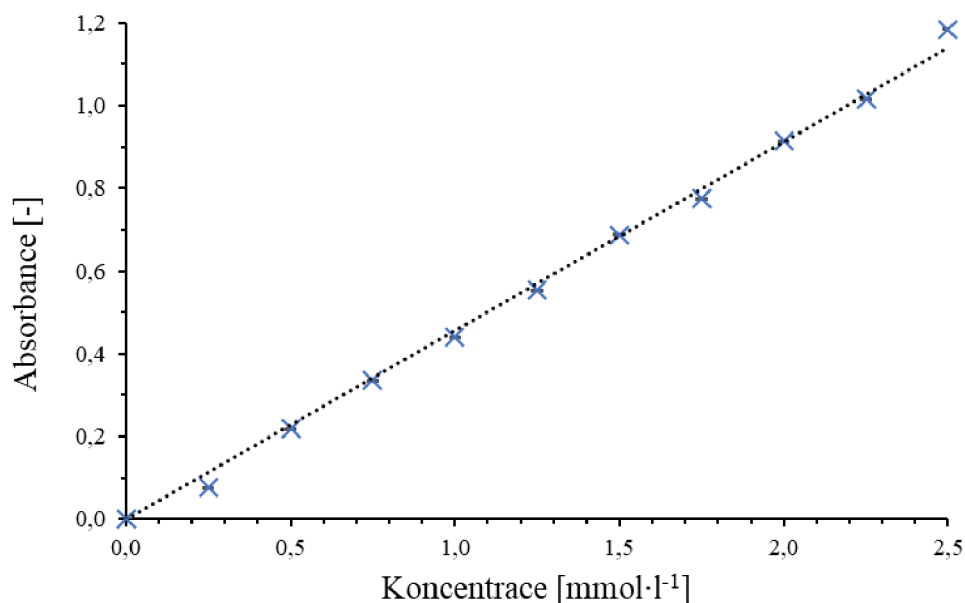




Obrázek 14: Kalibrační křivka  $\text{NO}_2^-$



Obrázek 15: Kalibrační křivka  $\text{NO}_3^-$



Obrázek 16: Kalibrační křivka H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Experiment za využití nádobového pokusu s vybranou modelovou rostlinou *Lactuca sativa* započal 3. 10. 2022. Od tohoto dne byly pravidelně zalévány květináče v growboxu příslušnými zálivkami (DW, PAW<sub>2</sub>, PAW<sub>5</sub> a PAW<sub>10</sub>). Potřebný objem k zalévání květináčů byl postupně přizpůsobován vegetačnímu stádiu rostlin podle Tabulky 8.

Tabulka 8: Optimalizace množství zálivky

V zálivky [ml]		V zálivky [ml]	
03.10.2022	100	18.11.2022	150
05.10.2022	100	21.11.2022	100
07.10.2022	150	23.11.2022	100
10.10.2022	100	25.11.2022	150
12.12.2022	100	28.11.2022	100
14.10.2022	150	30.11.2022	100
17.10.2022	100	02.12.2022	150
19.10.2022	100	05.12.2022	100
21.10.2022	150	07.12.2022	100
24.10.2022	100	09.12.2022	150
26.10.2022	100	12.12.2022	100
28.10.2022	150	14.12.2022	100
31.10.2022	100	16.12.2022	150
02.11.2022	100	19.12.2022	100
04.11.2022	150	21.12.2022	100
07.11.2022	100	23.12.2022	150
09.11.2022	100	27.12.2022	100
11.11.2022	150	29.12.2022	100
14.11.2022	100	02.01.2023	100
16.11.2022	100		

Analýza PAW probíhala v pravidelných intervalech (jednou za 7 dní) po celou dobu experimentu. Charakterizace byla prováděna také pro srovnávací vzorek, kterým byla destilovaná voda. Pomocí kalibračních rovnic byly vypočítány hodnoty obsahu aktivních látek v připravených zálivkách a tyto hodnoty byly kvůli lepší přehlednosti zprůměrovány. Koncentrace peroxidu vodíku byly převedeny na jednotky  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky této analýzy jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 9: Průměrný obsah aktivních látek v zálivkách používaných v experimentu

Typ zálivky	c ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	c ( $\text{NO}_2^-$ ) [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	c( $\text{NO}_3^-$ ) [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
DW	–	–	–
PAW <sub>2</sub>	0,67±0,00	1,07±0,01	6,28±2,75
PAW <sub>5</sub>	0,86±0,01	1,13±0,02	9,10±2,22
PAW <sub>10</sub>	0,73±0,00	2,15±0,03	16,40±5,84

Ze stanovených hodnot koncentrací peroxidu vodíku je patrné, že se od sebe jednotlivé zálivky v obsahu peroxidu vodíku významně neliší. Nejvyšší koncentrace byla stanovena u PAW aktivované po dobu 5 minut (PAW<sub>5</sub>) a nejnižší u PAW aktivované po dobu 2 minut (PAW<sub>2</sub>). Rozdíly mezi zálivkami jsou již patrnější v případě obsahu dusitanů a dusičnanů. Koncentrace dusitanů má nejvyšší hodnotu u PAW aktivované po dobu 10 minut (PAW<sub>10</sub>) a nejnižší opět u PAW<sub>2</sub>. Prakticky totožné jsou výsledky i u dusičnanových iontů. Opět se zde vyskytuje nejvyšší hodnota koncentrace u PAW<sub>10</sub> nejnižší hodnota u PAW<sub>2</sub>.

Dusitanové a dusičnanové ionty jsou velmi důležité pro růst rostlin, nicméně jejich nadměrné množství může mít negativní dopad jak na jejich růst a vývoj, tak na životní prostředí. Obecně je pro aplikace v zemědělství udávána optimální koncentrace dusitanů v rozmezí hodnot 1–2 mg/l a dusičnanů v rozmezí 5–10 mg/l. Pokud srovnáme tyto hodnoty s hodnotami uvedenými v Tabulce 9, tak dojdeme k závěru, že dusitanových iontů bylo vytvořeno optimální množství. Naproti tomu u dusičnanových iontů splňuje optimální rozmezí koncentrací vhodných pro aplikace v zemědělství voda aktivovaná po dobu 2 a 5 minut. Samozřejmě je důležité brát v potaz, že tyto hodnoty se mohou lišit v závislosti na typu půdy a plodin.

Celkově lze konstatovat, že koncentrace aktivních látek v připravených roztocích pozvolna stoupala se zvyšující se dobou působení dielektrického bariérového výboje na kapalinu. Rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi nejsou nijak zvlášť patrné, s výjimkou koncentrace dusičnanových iontů v PAW<sub>10</sub>, kde hodnota narostla oproti PAW<sub>5</sub> až o 6  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Dalšími vlastnostmi, které byly pravidelně analyzovány, jsou pH a elektrická vodivost PAW. Jedná se o jedny z nejdůležitějších parametrů, které zajišťují, že je připravená PAW v souladu s požadovanými specifikacemi, a je tedy vhodná pro následné použití. Parametry byly měřeny ihned po ukončení výboje a získané hodnoty byly opět zprůměrovány a zaznamenány do Tabulky 10 a 11.

Tabulka 10: Průměrné hodnoty pH zálivek používaných v experimentu

Typ zálivky	pH [-]
DW	7,2±0,1
PAW <sub>2</sub>	5,9±0,2
PAW <sub>5</sub>	4,1±0,1
PAW <sub>10</sub>	3,7±0,3

Tabulka 11: Průměrné hodnoty elektrické vodivosti zálivek používaných v experimentu

Typ zálivky	G [ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ]
DW	40±3
PAW <sub>2</sub>	55±3
PAW <sub>5</sub>	80±1
PAW <sub>10</sub>	190±2

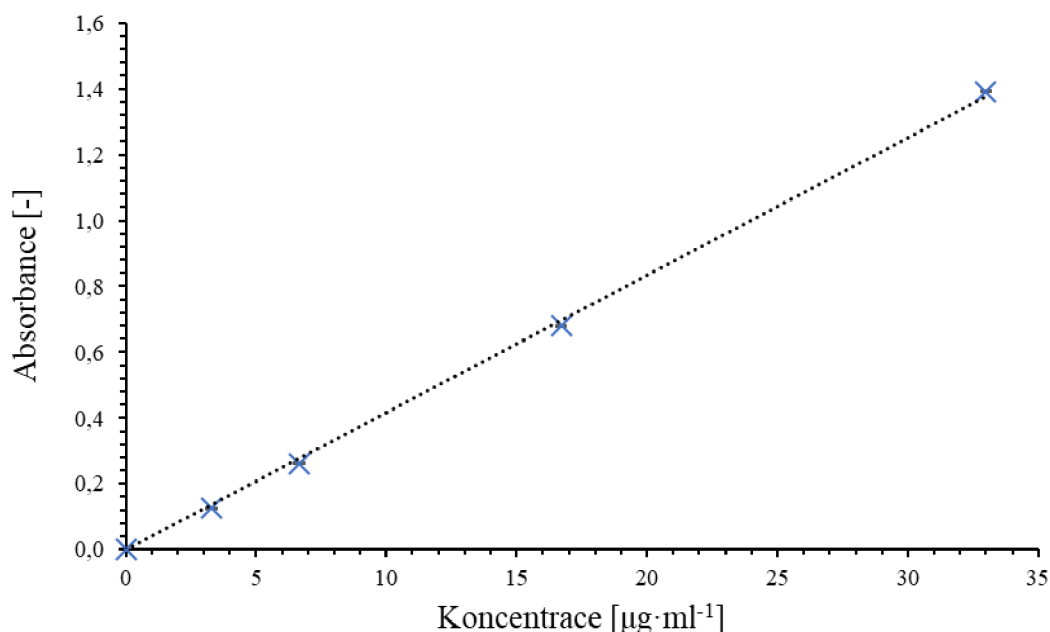
Je obecně známo, že hodnoty pH a vodivosti PAW se mohou lišit v závislosti na mnoha faktorech, jako je délka a intenzita procesu aktivace, na použité výchozí kapalině apod. Jak je viditelné v Tabulce 10, tak došlo k výraznému okyselení připravovaných roztoků s rostoucí dobou působení výboje. V případě vodivosti docházelo s rostoucí dobou působení výboje k výraznému zvýšení vodivosti výsledných roztoků. Tyto výsledky jsou v souladu s dostupnou literaturou [50,65], kdy bylo potvrzeno, že po vystavení kapaliny plazmovému výboji dochází v závislosti na zvyšující se době ošetření ke snížení hodnot pH a zvýšení vodivosti připravených roztoků PAW.

## 5.2 Stanovení dehydrogenázové aktivity

Na základě normy ISO 23753-1 [71] byly připraveny kalibrační roztoky, jejichž absorbance byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 485 nm proti referenčnímu vzorku acetonu za použití křemenné kyvety. Měření probíhalo díky nestálosti TPF na světle ihned po přípravě roztoků. Pro jednotlivé koncentrace vzorků byly odečteny hodnoty absorbance, které byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci. Z kalibrační křivky viditelné na Obrázku 17 byla získána kalibrační rovnice pro stanovení koncentrace TPF, která má tvar:

$$A = 0,0418 \cdot c_{TPF} \quad (11)$$

kde  $A$  představuje absorbanci roztoku a  $c$  koncentraci TPF ve vzorku v  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



Obrázek 17: Kalibrační křivka TPF

Prostřednictvím kalibrační rovnice (11) byly vypočteny hodnoty koncentrace TPF ve vzorcích přirozeně vlhké půdy. Pomocí těchto hodnot s využitím rovnice (7) byly získány hodnoty aktivity dehydrogenázy ve vzorcích půdy. Pro lepší přehlednost při vyhodnocování výsledků byly výsledné hodnoty pro jednotlivé typy zálievek zprůměrovány a jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12: Průměrné výsledné hodnoty stanovení DHA pro jednotlivé typy zálievek

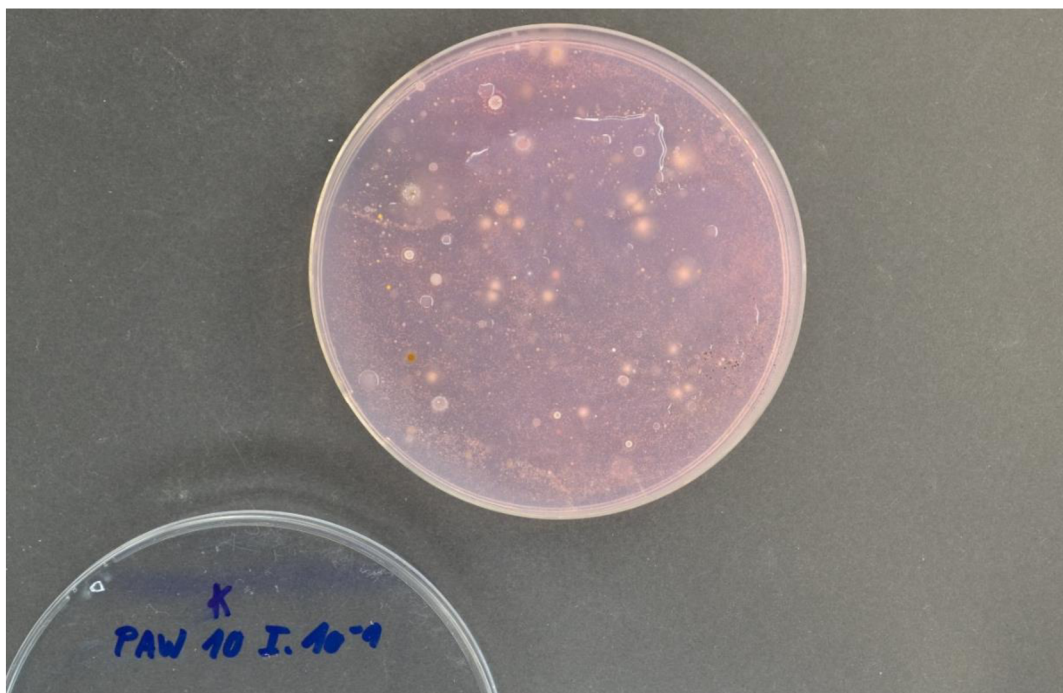
Typ zálievky	A [-]	$c_{\text{TPF}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	a [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ]
DW	0,12±0,05	2,95±1,16	2,48±0,98
PAW <sub>2</sub>	0,12±0,04	2,77±0,04	2,32±0,04
PAW <sub>5</sub>	0,13±0,05	3,16±0,05	2,66±0,04
PAW <sub>10</sub>	0,18±0,02	4,20±0,50	3,49±0,42

Výsledné hodnoty aktivity dehydrogenázy uvedené v Tabulce 12 srovnávají aktivitu mikroorganismů ve vzorcích půdy zalévaných destilovanou vodou a vodou aktivovanou plazmatem po dobu 2–10 minut. V případě PAW s dobou aktivace 2 a 5 minut (PAW<sub>2</sub> a PAW<sub>5</sub>) jsou hodnoty DHA srovnatelné s hodnotami aktivit ve vzorcích zalévaných destilovanou vodou. Naproti tomu PAW s dobou aktivace 10 minut (PAW<sub>10</sub>) prokazuje, že půda zalévaná touto vodou vykazuje vyšší mikrobiální aktivitu než půda zalévaná vodou destilovanou. Tento fakt by mohl znamenat, že při aplikaci PAW s delší dobou aktivace na půdu by docházelo k podpoře její mikrobiální aktivity. Celkově lze ale říci, že všechny hodnoty jsou si velmi podobné, a tedy že PAW neměla na aktivitu mikroorganismů v půdě výrazně pozitivní, ale ani negativní vliv. Järvan a spol. [73] ve svém výzkumu prováděli analýzy mikrobiálních komunit a enzymové aktivity dehydrogenázy ve vzorcích půdy za použití různých zemědělských metod. Dle zjištěných výsledků byla dehydrogenázová aktivita v půdním prostředí stanovena v rozmezí hodnot 0,75–1,21  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

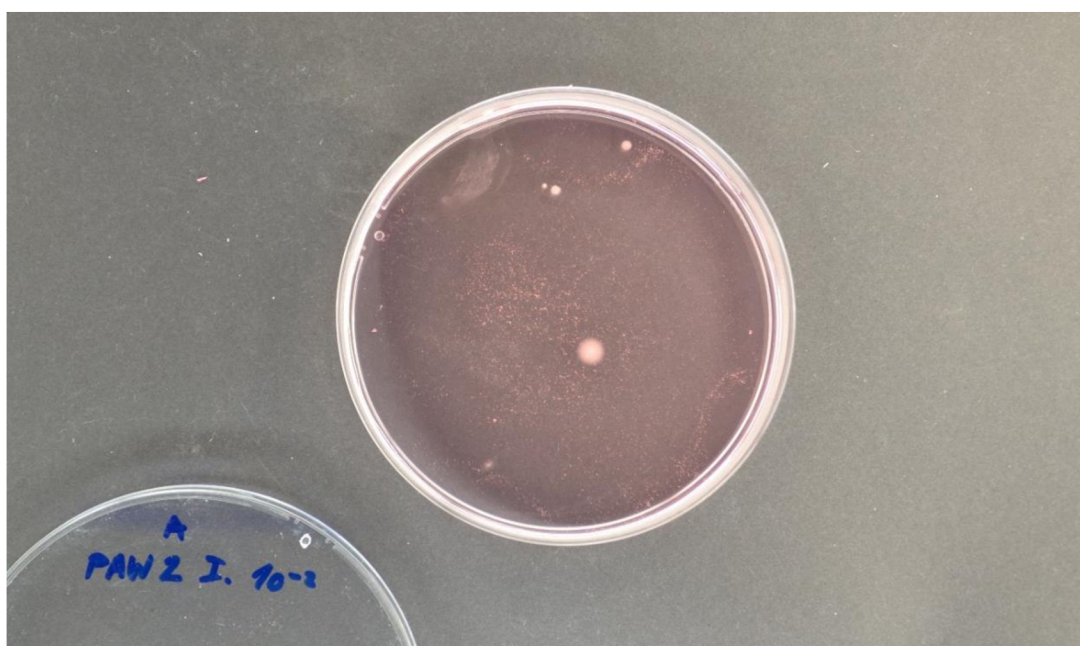
Pokud srovnáme tyto výsledky s výsledky uvedenými v Tabulce 12 tak zjistíme, že stanovené hodnoty dehydrogenázové aktivity v rozmezí 2,3–3,5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  získané po aplikaci PAW převyšují hodnoty stanovené v půdním prostředí při využití tradičních agrotechnických postupů. PAW by tedy teoreticky mohla mít pozitivní vliv na DHA a tím i dopad na zlepšení kvality půdy a zvyšování výnosů zemědělských plodin.

### **5.3 Stanovení vlivu PAW na dusík fixující bakterie**

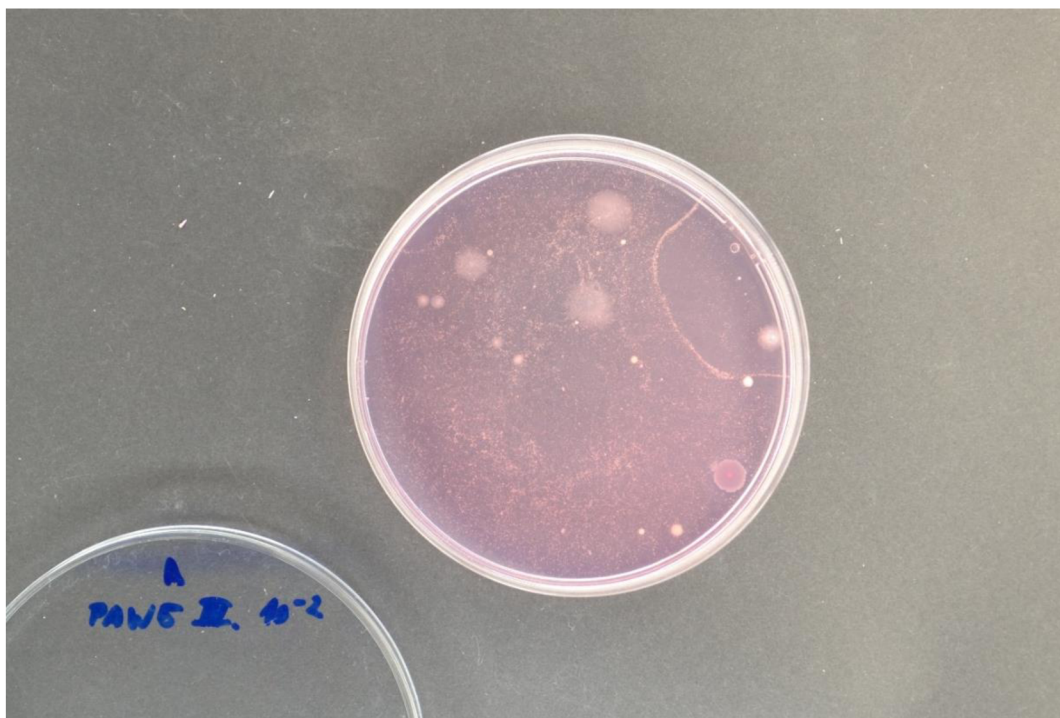
Ke stanovení počtu dusíkatých bakterií v půdních vzorcích byl použit Ashbyho mannitolový agar. Jedná se o selektivní médium používané pro růst a kultivaci nesymbiotických dusík fixujících bakterií, jako je například druh *Azotobacter spp.* Bakterie fixující dusík mohou využívat jako zdroj uhlíku mannitol a mají schopnost nesymbioticky fixovat atmosferický dusík anaerobně, což je právě jejich specifitou v porovnání s jinými mikroorganismy. Právě na základě této specifity je pak možné z celého půdního společenství selektivně kultivovat a kvantifikovat dusík fixující bakterie. Pro stanovení počtu těchto bakterií byla použita zředovací plotnová metoda. Narostlé kolonie byly počítány ručně. Každý půdní vzorek byl nezávisle zkoumán celkem 3×. Nejprve byl proveden pilotní experiment, kdy bylo očkování prováděno přímo z nekultivované půdy. V tomto případě se nepovedlo výsledky vyhodnotit, jelikož nedošlo k žádnému nárůstu bakteriálních kolonií. Následně bylo očkování prováděno z půdních suspenzí. Toto měření již bylo více optimalizované, ale použitá ředění byla příliš nízká. To způsobilo slití narostlých kolonií, a tak opět nebylo možné výsledky vyhodnotit. Problémem byla také barva agarů, která byla bělavá stejně jako barva narostlých bakteriálních kolonií. To způsobilo horší viditelnost kolonií, které pak nebylo možné spočítat. Měření tedy proběhlo ještě jednou při optimálním zředění, a navíc bylo do živného média přidáno přírodní potravinářské barvivo, díky němuž měl agar od kolonií odlišnou barvu. Kolonie pak byly mnohem lépe rozeznatelné a počítatelné. V případě druhého měření byly použité půdní suspenze týden kultivovány při 37 °C na třepačce. Tyto suspenze byly už od pohledu zakalené, což svědčilo o přítomnosti mikroorganismů. Pro příklad jsou některé Petriho misky s narostlými koloniemi zobrazeny na Obrázcích 18, 19 a 20.



Obrázek 18: Bakteriální kolonie narostlé ze suspenze půdy zalévané PAW aktivovanou po dobu 10 minut se zředěním  $10^{-1}$



Obrázek 19: Bakteriální kolonie narostlé ze suspenze půdy zalévané PAW aktivovanou po dobu 2 minut se zředěním  $10^{-2}$



Obrázek 20: Bakteriální kolonie narostlé ze suspenze půdy zalévané PAW aktivovanou po dobu 5 minut se zředěním  $10^{-2}$

Celkem bylo tedy vytvořeno 5 ředění ( $1 \cdot 10^{-1}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$  (2×),  $1 \cdot 10^{-4}$ ), přičemž do výsledků byla zahrnuta pouze ředění  $1 \cdot 10^{-1}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ . Poslední ředění již nebylo počítatelné z důvodu malého nárůstu kolonií, a tedy se nedalo považovat za validní.

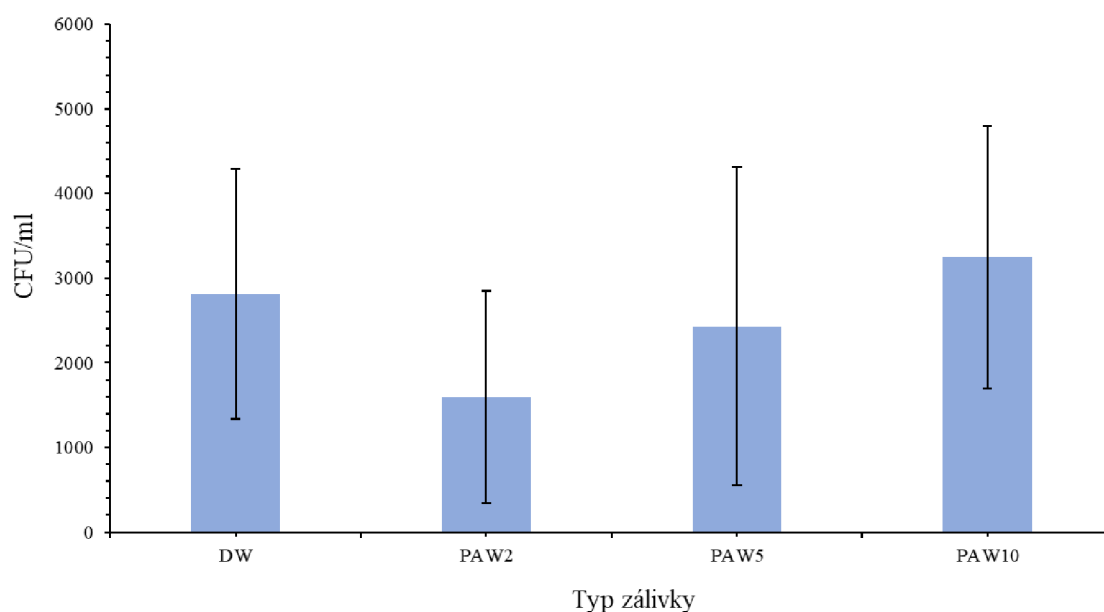
Počty kolonií byly sečteny a následně byl stanoven počet jednotek tvořících kolonie (CFU) na 1 ml. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 13.

Tabulka 13: Průměrné počty narostlých kolonií

	$1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	CFU·ml <sup>-1</sup>
DW	126	297	420	2809±1476
PAW <sub>2</sub>	118	60	300	1594±1252
PAW <sub>5</sub>	136	133	460	2430±1879
PAW <sub>10</sub>	347	160	467	3247±1546

Průměrné hodnoty koncentrace buněk v jednotkách CFU·ml<sup>-1</sup> byly vyneseny do grafu (viz Obrázek 21) společně se směrodatnou odchylkou.





Obrázek 21: Porovnání počtu narostlých kolonií N-bakterií pro různé závlivky

Z uvedených výsledků je patrné, že bakterie fixující dusík v půdě přežívají i po zalévání vodou ošetřenou pomocí plazmatu (PAW). Nicméně v případě PAW aktivované po dobu 2 minut (PAW<sub>2</sub>) lze v porovnání s destilovanou vodou pozorovat pokles v počtu narostlých kolonií téměř o polovinu. Voda ošetřovaná plazmatem po dobu 5 minut (PAW<sub>5</sub>) vykazuje dle výsledků lehký pokles bakteriálních kolonií v porovnání s kontrolním vzorkem destilované vody. U vody aktivované po dobu 10 minut (PAW<sub>10</sub>) lze na rozdíl od PAW<sub>2</sub> a PAW<sub>5</sub> sledovat jistý mírný nárůst v počtu kolonií oproti destilované vodě. To může být vysvětleno tím, že při aktivaci trvající po dobu 10 minut je koncentrace dusitanových a dusičnanových iontů vyšší než v případě PAW<sub>2</sub> a PAW<sub>5</sub>. PAW aktivovaná po dobu 2–5 minut má koncentraci těchto aktivních iontů příliš malou na to, aby došlo k výraznému podpoření růstu mikrobů. Tyto výsledky také korelují s výsledky uvedenými v kapitole 5.1.

Výsledné počty kolonií byly zpracovány pomocí statistického aparátu softwaru Microsoft Excel při hladině významnosti 0,05. Obecně lze z výsledků vyvodit, že mezi zkoumanými podmínkami není statisticky významný rozdíl, což dokazuje hodnota statistického ukazatele, která má hodnotu  $p = 0,063$ . PAW vyrobená pomocí dielektrického bariérového výboje nevykazuje výrazné pozitivní účinky na životaschopnost N-fixujících bakterií v půdě. Výjimkou by mohla být PAW s delší dobou aktivace, díky vyššímu obsahu dusitanů a dusičnanů, které mají pozitivní vliv na růst a vývoj rostlin, čímž mohou být nepřímo ovlivněny i dusík fixující bakterie žijící s rostlinami v symbióze.

V článku [74] zaměřujícím se na studium tvorby chemicky aktivních látek v roztocích za použití dielektrického bariérového výboje byl stejně jako v mnoha dalších studiích potvrzen silný antimikrobiální efekt PAW připravené pomocí tohoto výboje. Původním předpokladem této práce tedy bylo, že by PAW vyrobená pomocí tohoto systému mohla vykazovat antimikrobiální účinky i v půdě. Nicméně ve zmíněném výzkumu byl studován vliv PAW pouze na jeden modelový bakteriální typ (*Escherichia Coli TOP10*) za laboratorních podmínek.

Procesy v půdním prostředí jsou ale podstatně komplexnější a z toho důvodu je do budoucna nutné stanovit další metody, kterými by mohly být procesy iniciované plazmatem aktivovanou vodou detailněji charakterizovány. Navzdory potvrzené antimikrobiální aktivitě PAW připravené prostřednictvím DBD z výsledků uvedených v Tabulce 13 vyplývá, že takto připravená PAW neměla na vitalitu N-fixujících bakterií ani výrazně negativní účinek. Tento fakt by mohl být dobrým předpokladem pro další výzkum v oblasti aplikace PAW vyrobené pomocí DBD v zemědělství.

Důležité je poznamenat, že pokud je PAW připravována z jiných roztoků nebo pomocí jiných plazmových systémů než z destilované vody pomocí DBD, může se pak chovat velmi odlišně od PAW připravené způsobem popsaným v této práci. Jiné roztoky mohou obsahovat různé nečistoty a minerály, které mohou mít vliv na chemické vlastnosti vody a tím i na připravenou PAW. Stejně tak, jiné plazmové systémy mohou mít různé parametry (teplota, tlak, proud apod.), což může mít opět vliv na proces tvorby PAW.

Aplikace PAW, jak dokazují výsledky stanovení dehydrogenázové aktivity diskutované v kapitole 5.2, nemá negativní vliv na enzymatickou aktivitu v půdě. Vhodná hodnota aktivity dehydrogenázy může pozitivně ovlivnit přítomnost a aktivitu N-fixujících bakterií v půdě. Tato aktivita totiž indikuje přítomnost organických látek v půdě, které jsou důležitým zdrojem uhlíku pro mikroorganismy. Bakterie mohou využít tento uhlík k tvorbě enzymů fixujících dusík, což může vést ke zvýšené aktivitě těchto bakterií. Tím se zvyšuje množství dusíku dostupného pro rostliny a N-fixující bakterie tak vykazují pozitivní vliv na celkový stav půdy. Pozitivní vliv N-fixujících bakterií především na růst a vývoj plodin a na celkové vylepšení vlastností půdy pro zemědělskou produkci byl taktéž potvrzen řadou výzkumů [75,76].

Ve vzorku půdy, který byl zaléván PAW<sub>10</sub>, byla zaznamenána nejvyšší hodnota aktivity enzymu dehydrogenázy a současně nejvyšší hodnota počtu narostlých kolonií N-fixujících bakterií. Výsledky této diplomové práce tedy prokazují pozitivní vliv PAW<sub>10</sub> na dehydrogenázovou aktivitu v půdě a tím i na vitalitu N-fixujících bakterií.

## 6 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium vlivu plazmatem aktivované vody připravené pomocí dielektrického bariérového výboje za atmosférického tlaku na půdní mikrobiální aktivitu v souvislosti s obsahem chemicky aktivních látek s dlouhou dobou života, tzv. *long life species*. V posledních letech se stala plazmatem aktivovaná voda populárním tématem v oblasti zemědělství, protože nabízí oproti běžné vodě mnoho výhod. Jelikož její příprava je relativně jednoduchá a levná, tak by mohla snížit, nebo úplně nahradit používání tradičních chemických pesticidů a hnojiv, jejichž výroba je ekonomicky náročná. Taktéž by se PAW mohla stát ekologičtější alternativou těchto hnojiv i díky tomu, že na rozdíl od nich není toxická, což by mělo pozitivní dopad na životní prostředí. Navíc by mohla být používána ve formě postřiků právě díky svým antimikrobiálním a antivirovým vlastnostem, čímž by přispívala ke snížení počtu škodlivých mikroorganismů a virů, které mohou napadat rostliny. V mnoha výzkumech byl dokázán její vliv na zlepšení schopnosti rostlin absorbovat potřebné živiny, čímž je přispíváno k lepšímu růstu plodin. Je však důležité poznamenat, že výzkum v oblasti PAW v zemědělství je stále poměrně nový a nedostačující. Tato práce se snažila být nápomocná k potřebnému posouzení účinnosti a bezpečnosti použití PAW právě v této oblasti.

Za účelem vyhodnocení enzymatické aktivity ve vzorcích černozemě byl připraven nádobový experiment. Doba tohoto experimentu měla trvání 90 dní, během kterých byla na půdní vzorky pravidelně aplikována připravená zálivka v podobě plazmatem aktivované vody s dobou aktivace 2, 5 a 10 minut a také destilovaná voda, která sloužila jako kontrolní vzorek. Je důležité poznamenat, že PAW byla vždy čerstvě připravována těsně před zaléváním a charakterizací.

Během experimentu byla pravidelně prováděna fyzikálně-chemická analýza připravené PAW. Byl sledován obsah chemicky aktivních látek, konkrétně peroxidu vodíku a dusitanových a dusičnanových iontů. Na základě analýzy PAW bylo zjištěno, že obsah těchto chemicky aktivních látek během působení elektrického výboje na kapalinu lineárně s časem narůstal. V PAW aktivované po dobu 2 minut byla stanovena koncentrace  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,67 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\text{NO}_2^-$   $1,07 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $\text{NO}_3^-$   $6,28 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . V PAW aktivované po dobu 5 minut byla stanovena koncentrace  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,86 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\text{NO}_2^-$   $1,13 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $\text{NO}_3^-$   $9,10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . V PAW aktivované po dobu 10 minut byla stanovena koncentrace  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,73 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\text{NO}_2^-$   $2,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $\text{NO}_3^-$   $16,40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z výsledků bylo dále zjištěno, že v kyselém prostředí je koncentrace dusitanů nižší než dusičnanů. To je způsobeno tím, že v kyselém prostředí dochází rychleji k oxidaci dusitanů na dusičnany. pH připravených roztoků PAW bylo kyselé a klesalo se zvyšující se dobou působení výboje na kapalinu. V zemědělství se obvykle doporučuje používat PAW s mírně kyselým pH. Příliš vysoké pH by tedy mohlo mít negativní vliv na účinnost PAW v zemědělských aplikacích. Nicméně z mnoha výzkumů vyplývá, že optimální hodnota pH pro PAW aplikovanou v zemědělství se může lišit v závislosti na konkrétních podmínkách a typech plodin. Vodivost připravených roztoků se naopak s dobou působení výboje na kapalinu zvyšovala.

Ke stanovení enzymové aktivity byl zjištěn obsah TPF v půdních vzorcích a prostřednictvím toho byla vypočtena dehydrogenázová aktivita. Pro PAW<sub>2</sub> byla stanovena hodnota DHA 2,3  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , pro PAW<sub>5</sub> 2,7  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  a pro PAW<sub>10</sub> 3,5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Ve srovnávacím vzorku byla hodnota DHA stanovena na 2,5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Z těchto získaných výsledků vyplynulo, že půda zalévaná PAW vykazuje mírně vyšší mikrobiální aktivitu než voda destilovaná. Aby bylo možné tento výsledek skutečně potvrdit, muselo by dojít k opakování pokusu s větším množstvím dat za použití různých druhů rostlin a typů půd. Nejvyšší hodnotu DHA prokazovala PAW<sub>10</sub> i navzdory tomu, že hodnota pH PAW<sub>10</sub> byla 3,7. To dokazuje, že nízké hodnoty pH nemají negativní dopad na aktivitu dehydrogenázy v půdě. Zároveň je důležité brát v potaz, že výsledky DHA mohly být ovlivněny mnoha faktory včetně teploty, vlhkosti, pH a koncentrace půdního substrátu.

V případě tohoto experimentu šlo především o prokázání dobrého stavu půdního mikrobiomu i po aplikaci PAW na půdu. Jak bylo již dříve zmíněno, tak PAW působí na mikroorganismy inhibičními účinky, což ale není u všech aplikací výhodou. V případě bakterií fixující dusík se jedná o mutualistické soužití rostlin a N-fixujících bakterií, tudíž tyto bakterie jsou pro rostlinu prospěšné a bylo by nežádoucí jim nějakým způsobem škodit. Z tohoto důvodu bylo předmětem diplomové práce taktéž zkoumání vlivu PAW na jejich vitalitu. Tyto bakterie jsou schopny fixovat vzdušný dusík a vytvářejí organický zdroj dusíku ( $\text{NH}_4^+$ ), který je důležitý pro růst rostlin a PAW umožňuje vázat dusík do anorganických iontů, které jsou pro rostliny dobře využitelné. Tímto způsobem je PAW schopna poskytnout rostlinám externí bonusový dusík a nahradit tak hnojiva, aniž by přitom poškodila mikroorganismy v půdě. PAW tedy může být výhodným řešením pro zlepšení rostlinné produkce a snížení negativního vlivu použití hnojiv na životní prostředí.

Tato diplomová práce testovala předpoklad, že po aplikaci závlivky s vysokým obsahem dusičnanových a dusitanových iontů na vzorek půdy dojde k větší podpoře růstu bakteriálních kolonií v porovnání s kontrolními vzorky půdy. Výsledky poukázaly na nesoulad s tímto předpokladem, nicméně bylo prokázáno, že i přes silnou antimikrobiální aktivitu PAW, která byla prokázána v řadě výzkumů [74], nedochází při aplikaci PAW připravené pomocí DBD na půdu k inhibici růstu N-fixujících bakterií. PAW by tedy neměla mít negativní vliv na průběh dusíkového cyklu v půdě.

Na závěr je důležité zmínit, že v současné době je výzkum v oblasti PAW v zemědělství stále v raných fázích. Vliv PAW vyrobené pomocí dielektrického bariérového výboje na mikrobiální aktivitu v půdě je nedostatečně prozkoumaným tématem a nejsou k dispozici žádné zdroje, se kterými by se daly výsledky porovnat. Tato práce by mohla sloužit jako pilotní experiment pro další navazující výzkum v této oblasti.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠIMEK, M. Základy nauky o půdě. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 2003. ISBN 80-704-0629-1.
- [2] ŠIMEK, M., D. ELHOTTOVÁ a V. PIŽL. Rozmanitost života a zdraví ekosystémů: Živá půda. Národní 3, 117 20 Praha 1: Středisko společných činností AV ČR, 2015. ISBN 978-80-200-2567-8.
- [3] BIČÍK, I. aj. CIBULKA. Půda v České republice. Praha: Pro Ministerstvo životního prostředí a Ministerstvo zemědělství vydal Consult, 2009. ISBN 80-903-4824-6.
- [4] VOPRAVIL, J. Půda a její hodnocení v ČR. Praha: Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, 2011. ISBN 978-80-87361-02-3.
- [5] PAVLŮ, L. Základy pedologie a ochrany půdy. Česká zemědělská univerzita v Praze, 2018. ISBN 978-80-213-2876-1.
- [6] Situační a výhledová zpráva: Půda. Praha: Ministerstvo zemědělství České republiky, 2021. ISBN 978-80-7434-598-2. ISSN 1211-7692.
- [7] Základní půdní složky: Přibližné zastoupení půdních složek v hmotnostních %. In: Význam půdních mikroorganismů pro produkční a mimoprodukční funkce půdy. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/print.php?page=3969&typ=html](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=3969&typ=html)
- [8] VRBA, V. a L. HULEŠ: Humus-půda-rostlina (2) Humus a půda. Biom.cz. 2006-11-14. ISSN: 1801-2655.
- [9] JANDÁK, J., E. POKORNÝ a A. PRAX. Půdoznalství. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2001. ISBN 978-80-7157-559-7.
- [10] STEVENSON, Frank J. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. New York: J. Wiley, 1982. A Wiley-Interscience Publications. ISBN 04-710-9299-1.
- [11] POSPÍŠILOVÁ, L. a M. TESAŘOVÁ. Organický uhlík obhospodařovaných půd: Organic carbon in arable soils: původní vědecká práce. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2009. Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeli
- [12] ČERNÝ, J. a kol. Organická hmota v půdě, její obsah, složky a význam. agromanual.cz. Česká zemědělská univerzita v Praze: Kurent, 5. 11. 2019. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/vyziva-a-stimulace/hnojeni/organicka-hmota-v-pude-jeji-obsah-slozky-a-vyznam>
- [13] SZOMBATHOVÁ, N. Chemické a fyzikálno-chemické vlastnosti humusových látek pôd ako ukazovateľ antropogénnych zmien v ekosystémoch (lokality Báb a Dolná Malanta). Slovenská republika: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2010, 96 s. ISBN 978
- [14] SCHNITZER, M. a C. M. MONREAL. Quo Vadis Soil Organic Matter Research? A Biological Link to the Chemistry of Humification. In: . Elsevier, 2011, 2011, s. 143-21. Advances in Agronomy. ISBN 9780123864734. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386473
- [15] SOTÁKOVÁ, S. Organická hmota a úrodnosť pôdy. Bratislava: Príroda, 1982. Rastlinná výroba.

- [16] KUMADA, K. 1987. Chemistry of soil organic matter. Tokyo: Japan Scientific, 270 s.
- [17] PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, 2001, 166(11):p 810-832
- [18] SUTTON, R. a G. SPOSITO. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. In: 2005, s. 9009-9015. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es050778q
- [19] LEHMANN, Johannes a Markus KLEBER. The contentious nature of soil organic matter. *Nature*. 2015, 528(7580), 60-68. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature16069
- [20] HENIS, Y. Soil microorganisms, soil organic matter and soil fertility. In: *The Role of Organic Matter in Modern Agriculture*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1986, 1986, s. 159-168. ISBN 978-94-010-8470-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-009-4426-8\_7
- [21] HADAR, Y. The role of organic matter in the introduction of biofertilizers and biocontrol agents to soils. In: *The Role of Organic Matter in Modern Agriculture*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1986, 1986, s. 169-179. ISBN 978-94-010-8470-3. Dostupné z doi:10.1007/978-94-009-4426-8\_8
- [22] VERMA, R., H. ANNAPRAGADA, N. KATIYAR, N. SHRUTIKA, K. DAS a S. MURUGESAN. Rhizobium. In: *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Elsevier, 2020, 2020, s. 37-54. ISBN 9780128234143. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-823414-3.00004-6
- [23] VOPRAVIL, J., M. BATYSTA, L. HAVELKOVÁ, et al. Hodnocení půd z hlediska jejich produkčních a mimoprodukčních funkcí s dopady na plošnou a kvalitativní ochranu půd v České republice. Praha: Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, 2012.
- [24] BIOM: Půda a organická hmota. Praha, 2019. ISSN 1801-4038.
- [25] BORŮVKA, L., BATYSTA, M. a kol., 2010: Laboratory Assay of Aluminium Transport through Intact Soil Sample under Controlled Conditions. *Soil and Water Research*. 5 roč., č. 2, s. 69–74. ISSN 1801-5395.
- [26] LG, A. D. Role of Azotobacter in soil fertility and sustainability. *Advances in Plants & Agriculture Research*. 2015, 2(6), 250–253. ISSN 23736402. Dostupné z: doi:10.15406/apar.2015.02.00069
- [27] BROADBENT, F. E. Effects of organic matter on nitrogen and phosphorus supply to plants. In: *The Role of Organic Matter in Modern Agriculture*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1986, 1986, s. 13-27. ISBN 978-94-010-8470-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-009-4426-8\_2
- [28] PHILIPPOT, L. a J.C. GERMON. Contribution of Bacteria to Initial Input and Cycling of Nitrogen in Soils. In: *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005, s. 159-176. *Soil Biology*. ISBN 3-540-22220-0. Dostupné z: doi:10.1007/3-540-26609-7\_8
- [29] BANDICK, A. K. a R. P. DICK. Field management effects on soil enzyme activities. In: *Soil Biology and Biochemistry*. 1999, s. 1471-1479. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/S0038-0717(99)00051-6

- [30] KISS, S., M. DRĂGAN-BULARDA a D. RĂDULESCU. Biological Significance of Enzymes Accumulated in Soil. In: Elsevier, 1975, 1975, s. 25-87. Advances in Agronomy. ISBN 9780120007271. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2113(08)70007-5
- [31] DICK, R. P., D. P. BREAKWELL a R. F. TURCO. Soil Enzyme Activities and Biodiversity Measurements as Integrative Microbiological Indicators. In: Methods for Assessing Soil Quality. Madison, WI, USA: Soil Science Society of America, 1997, 2015-10-26, s. 247-271. SSSA Special Publications. ISBN 9780891189442. Dostupné z: doi:10.2136/sssaspecpub49.c15
- [32] WOLIŃSKA, A. a Z. STEPŃIEWSKA. Dehydrogenase activity in the soil environment. Dehydrogenases, 2012, 10: 183-210.
- [33] GONG, P. Dehydrogenase activity in soil: A comparison between the TTC and INT assay under their optimum conditions. In: Soil Biology and Biochemistry. 1997, s. 211-214. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/S0038-0717(96)00290-8
- [34] CASIDA, L. E. JR.; KLEIN, D. A.; SANTORO, THOMAS. Soil dehydrogenase activity. Soil Science 98(6):p 371-376, December 1964.
- [35] FRANCIS F., Chen. Úvod do fyziky plazmatu. Praha: Academia, 1984, 328 s.
- [36] KREJČÍ V., Plazma, čtvrté skupenství hmoty, nak. Orbis, Praha, 1974, I. vydání.
- [37] AUBRECHT, V. Fyzika a diagnostika plazmatu (přednášky VEE 07-086). Brno: 2007. s. 118
- [38] MARTIŠOVITŠ, V. Základy fyziky plazmy: učebný text pre magisterské štúdium. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2006. ISBN 80-223-1983-X.
- [39] VEVERKA, A. Technika vysokých napětí. Praha: SNTL, 1978.
- [40] JIANG, B., J. ZHENG, S. QIU, M. WU, Q. ZHANG, Z. YAN a Q. XUE. Review on electrical discharge plasma technology for wastewater remediation. Chemical Engineering Journal. 2014, 236, 348-368. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2013.09.090
- [41] BRANDENBURG, R, Z NAVRÁTIL, J JÁNSKÝ, P ST'AHEL, D TRUNEC a H-E WAGNER. The transition between different modes of barrier discharges at atmospheric pressure. Journal of Physics D: Applied Physics. 2009, 42(8). ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/0022-3727/42/8/085208
- [42] Dielectric Barrier Discharge. Dostupné z: [https://www.matsusada.com/product/app/dielectric\\_barrier\\_discharge.html](https://www.matsusada.com/product/app/dielectric_barrier_discharge.html)
- [43] SCHOLTZ, V. Nízkoteplotná plazma I: Čo je to plazma? Aldebaran bulletin. 2012, ročník 10, č.22. ISSN 1214-1674. Dostupné z: [https://www.aldebaran.cz/bulletin/2012\\_22\\_pla.php](https://www.aldebaran.cz/bulletin/2012_22_pla.php)
- [44] NASTUTA, A. V., I. TOPALA, C. GRIGORAS, V. POHOATA a G. POPA. Stimulation of wound healing by helium atmospheric pressure plasma treatment. In: Journal of Physics D: Applied Physics. 2011. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/0022-3727/44/10/105204

- [45] ELIEZER, S. a Y. ELIEZER. The Fourth State of Matter: An Introduction to Plasma Science. 2nd edition. Institute of Physics Publishing, Dirac House, Temple Back, Bristol BS1 6BE, UK: Institute of Physics Publishing Bristol and Philadelphia, 2001. ISBN 0-7503-0740-4.
- [46] Corona Discharge – Enhancing adhesion capabilities. Dostupné z: <https://www.thierry-corp.com/plasma-knowledgebase/corona-discharge>
- [47] BRUGGEMAN, P. J.; KUSHNER, M. J.; LOCKE, B. R.; aj.: Plasma–liquid interactions: a review and roadmap. *Plasma Sources Science and Technology*, 25(5), 053002. doi:10.1088/0963-0252/25/5/053002
- [48] ŠUNKA, P. Impulsní elektrické výboje ve vodě a jejich využití v ekologii a medicíně. Ústav fyziky plazmatu AV ČR
- [49] RAMLI, N. A. H., S. K. ZAABA, M. T. MUSTAFFA, A. ZAKARIA a Shahrman A. B. Review on the development of plasma discharge in liquid solution. 2017, 030015. Dostupné z: doi:10.1063/1.4978833
- [50] ŠIMEČKOVÁ J., F. KRČMA, D. KLOFÁČ, L. DOSTÁL a Z. KOZÁKOVÁ. Influence of Plasma-Activated Water on Physical and Physical–Chemical Soil Properties. *Water*. 2020, roč.12, č. 9 DOI:10.3390/w12092357. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/207>
- [51] ZHOU, R., R. ZHOU, P. WANG, Y. XIAN, A. MAI-PROCHNOW, X. LU, P.J. CULLEN, K. OSTRIKOV a K. BAZAKA. Plasma activated water (PAW): generation, origin of reactive species and biological applications. *Journal of Physics D: Applied Physic*. 2020. DOI:10.1088/1361-6463/ab81cf. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/340068059\\_Plasma\\_activated\\_water\\_PAW\\_generation\\_origin\\_of\\_reactive\\_species\\_and\\_biological\\_applications](https://www.researchgate.net/publication/340068059_Plasma_activated_water_PAW_generation_origin_of_reactive_species_and_biological_applications)
- [52] THIRUMDAS R., A. KOTHAKOTA, U. ANNAPURE, K. SILIVERU, R. BLUNDELL, R. GATT a V. P. VALDRAMIDIS. Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. *Trends in Food Science & Technology*. 2018, 77, 21-31. ISSN 09242244. Dostupné z: doi: 10.1016/j.tifs.2018.05.007
- [53] BRUGGEMAN, P. J., M. J. KUSHNER, R. LOCKE, J. G. E. GARDENIERS, W. G. GRAHAM, D. B. GRAVES, R. C. H. M. HOFMAN-CARIS, D. MARIC, J. Reid, E. CERIANI, D. FERNANDEZ RIVAS, J. E. FOSTER, S. C. GARRICK, Y. GORBANEV, S. HAMAGUCHI, F. IZA, H. JABLONOWSKI, E. KLIMOVA, J. KOLB, ... a G. ZVEREVA. Figure 1: Schematic diagram of some of the most important species and mechanisms for an argon/humid. In: *osti.gov*. DOI: 10.1088/0963-0252/25/5/053002. Dostupné z: <https://www.osti.gov/pages/servlets/purl/1787626>
- [54] OEHMIGEN, K., M. HÄHNEL, R. BRANDENBURG, Ch. WILKE, K.-D. WELTMANN a Th. VON WOEDTKE. The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids. In: *Plasma Processes and Polymers*. 2010, s. 250-257. ISSN 16128850. Dostupné z: doi:10.1002/ppap.200900077
- [55] KLOUDA, P., 2017. Fyzikální chemie. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko. ISBN 978-80-86369-24-2.



- [56] XIANG, Q.; FAN, L.; LI, Y.; aj.: A review on recent advances in plasma-activated water for food safety: current applications and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, doi:10.1080/10408398.2020.1852173.
- [57] Měrná vodivost roztoku, Český lékopis. Dostupné z: [http://www.lekopis.cz/Kap\\_2\\_2\\_38.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_38.htm)
- [58] SHEN, J., Y. TIAN, Y. LI, R. MA, Q. ZHANG, J. ZHANG aj. FANG. Bactericidal Effects against *S. aureus* and Physicochemical Properties of Plasma Activated Water stored at different temperatures. In: *Scientific Reports*. 2016. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep28505
- [59] ZHANG, Y., B. CHEN, Z. XU, Z. SHI, S. CHEN, X. HUANG, J. CHEN a X. WANG. Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. *Journal of Experimental Botany*. 2014, 65(12), 3189-3200. ISSN 1460-2431. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/eru167
- [60] BURLICA, R., R.G. GRIM, K.-Y. SHIH, D. BALKWILL a B. R. LOCKE. Bacteria Inactivation Using Low Power Pulsed Gliding Arc Discharges with Water Spray. In: *Plasma Processes and Polymers*. 2010, s. 640-649. ISSN 16128850. Dostupné z: doi:10.1002/ppap.200900
- [61] FOX, J. B. Kinetics and mechanisms of the Griess reaction. In: *Analytical Chemistry*. 1979, s. 1493-1502. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac50045a032
- [62] HORÁKOVÁ, M., P. LISCHKE a A. GRÜNWARD. *Chemické a fyzikální metody analýzy vod*. Praha: SNTL, 1986, 389 s.
- [63] URSACHE, M., R. MORARU, E. HNATIUC, V. NASTASE a M. MARES. Comparative assessment of the relation between energy consumption and bacterial burden reduction using plasma activated water. 2014 International Conference on Optimization of Electrical and Electronic Equipment (OPTIM). IEEE, 2014, 2014, 1036-1041. ISBN 978-1-4799-5183-3. Dostupné z: doi:10.1109/OPTIM.2014.6850972
- [64] WANG, Q. a D. SALVI. Evaluation of plasma-activated water (PAW) as a novel disinfectant: Effectiveness on *Escherichia coli* and *Listeria innocua*, physicochemical properties, and storage stability. *LWT*. 2021, 149. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2021.111847
- [65] ZHAO, Y.-M., S. OJHA, C.M. BURGESS, D.-W. SUN a B.K. TIWARI. Inactivation efficacy and mechanisms of plasma activated water on bacteria in planktonic state. *Journal of Applied Microbiology*. 2020, 129(5), 1248-1260. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.14677
- [66] SIVACHANDIRAN, L. a A. KHACEF. Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment. *RSC Advances*. 2017, 7(4), 1822-1832. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C6RA24762H
- [67] ZHANG, S., A. ROUSSEAU a T. DUFOUR. Promoting lentil germination and stem growth by plasma activated tap water, demineralized water and liquid fertilizer. *RSC Advances*. 2017, 7(50), 31244-31251. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C7RA04663D

- [68] STOLERU, V., et al. Plant growth promotion effect of plasma activated water on *Lactuca sativa* L. cultivated in two different volumes of substrate. *Scientific Reports*, 2020, 10.1: 1-13.
- [69] BERTACCINI, A., et al. Plasma activated water to enhance plant defenses. In: *Proceedings of the 23rd International Symposium on Plasma Chemistry*, Montreal, Canada. 2017.
- [70] <https://mapy.geology.cz/pudy/#>
- [71] ČSN EN ISO 23753-1 (836490): Kvalita půdy – Stanovení aktivity dehydrogenázy v půdě – Část 1: Metoda používající trifenyltetrazolium chlorid (TTC). Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 09/2019. n. 1.
- [72] MIKANOVÁ, O., T. ŠIMON a D. CERHANOVÁ. Hodnocení kvality půdy biologickými metodami: metodika pro praxi. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2010. ISBN 978-80-7427-044-4.
- [73] JÄRVAN, M., L. EDESI, A. ADAMSON a T. VÕSA. Soil microbial communities and dehydrogenase activity depending on farming systems. *Plant, Soil and Environment*. 2014, 60(10), 459-463. ISSN 12141178. Dostupné z: doi:10.17221/410/2014-PSE
- [74] LIŠKOVÁ, K., L. ČECHOVÁ, Z. KOZÁKOVÁ a J. ČERVENÝ. Study of RONS formation in aqueous solutions using dielectric barrier discharge and its bactericidal effects. Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118/464, 612 00 Brno, 2022.
- [75] MALEK, M., P. PATEL a MEENUSAFAR. Effect of Nitrogen Fixing Bacteria for Plant Growth: Promotion of *plantago ovata* (Isabgol). *Vidya Balan*. Department of Microbiology and Biotechnology, School of Science, Gujarat University, Ahmedabad-Gujarat, 2019, 1, 63-79. ISSN 2321-1520.
- [76] HINDERSAH, R., Y. FIRMANSYAH a N. KURNIATI. Soil properties of agricultural area in karst terrain of Parakan, Pangandaran, West Java, Indonesia. *Journal of Degraded and Mining Lands Management*. InTech, 2021, 2012-11-14, 8(3), 2809-2814. ISBN 978-953-307-019-3. ISSN 2339076X. Dostupné z: doi:10.15243/jdmlm.2021.083.2809

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	střídavý proud
DBD	dielektrický bariérový výboj
DHA	dehydrogenázová aktivita
DW	destilovaná voda
HL	huminové látky
MW rezonátor	mikrovlnný rezonátor
ORP	oxidačně redukční potenciál
PAW	plazmatem aktivovaná voda
PAW <sub>2</sub>	plazmatem aktivovaná voda s dobou aktivace 2 minuty
PAW <sub>5</sub>	plazmatem aktivovaná voda s dobou aktivace 5 minut
PAW <sub>10</sub>	plazmatem aktivovaná voda s dobou aktivace 10 minut
RF rezonátor	radiofrekvenční rezonátor
ROS	reactive oxygen species
RNS	reactive nitrogen species
SOM	soil organic matter (půdní organická hmota)

## 9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schématický profil minerální půdy [1].....	9
Obrázek 2: Přibližné zastoupení jednotlivých půdních složek v hmotnostních % [7].....	10
Obrázek 3: Dielektrický bariérový výboj [42].....	24
Obrázek 4: Plazmová tryska [43].....	24
Obrázek 5: Korónový výboj [43].....	25
Obrázek 6: Výboje generované při interakci plazma-kapalina: (A) výboj v kapalině, (B) plazma v plynné fázi bez kontaktu s kapalinou, (C) plynné plazma s tekutou elektrodou, (D) povrchový výboj, (E) plazma v plynné fázi s rozptýlenou kapalnou fází (aerosol), (F) výboje v bublinách [47].....	26
Obrázek 7: Série reakcí probíhajících na rozhraní plyn-kapalina během generace PAW [53]	28
Obrázek 8: Lokalita odběru půdy (49°00'54,0" N; 16°35'56,4" E).....	38
Obrázek 9: Systém pro přípravu PAW: (1) vysokofrekvenční zdroj napětí, (2) DBD reaktor, (3) spínací hodiny.....	39
Obrázek 10: Kalibrační roztoky $\text{NO}_2^-$ v rozmezí koncentrací 0,05–1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .....	41
Obrázek 11: Kalibrační roztoky peroxidu vodíku v rozmezí koncentrací 0–2,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .....	42
Obrázek 12: Kalibrační roztoky TPF v rozmezí koncentrací 3,3–33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (foto bylo pořízeno po ukončení měření z důvodu nestability roztoků na světle).....	44
Obrázek 13: Charakteristické zbarvení roztoků po přidání acetonu (květináč č. I., zálivka PAW <sub>10</sub> ).....	45
Obrázek 14: Kalibrační křivka $\text{NO}_2^-$ .....	48
Obrázek 15: Kalibrační křivka $\text{NO}_3^-$ .....	48
Obrázek 16: Kalibrační křivka $\text{H}_2\text{O}_2$ .....	49
Obrázek 17: Kalibrační křivka TPF.....	52
Obrázek 18: Bakteriální kolonie narostlé ze suspenze půdy zalévané PAW aktivovanou po dobu 10 minut se zředěním $10^{-1}$ .....	54
Obrázek 19: Bakteriální kolonie narostlé ze suspenze půdy zalévané PAW aktivovanou po dobu 2 minut se zředěním $10^{-2}$ .....	54
Obrázek 20: Bakteriální kolonie narostlé ze suspenze půdy zalévané PAW aktivovanou po dobu 5 minut se zředěním $10^{-2}$ .....	55
Obrázek 21: Porovnání počtu narostlých kolonií N-bakterií pro různé typy zálivek.....	56

## 10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Kalibrační řada roztoků $\text{NO}_2^-$ .....	40
Tabulka 2: Kalibrační řada roztoků $\text{NO}_3^-$ .....	41
Tabulka 3: Kalibrační řada roztoků $\text{H}_2\text{O}_2$ .....	42
Tabulka 4: Úprava pH tris pufro.....	43
Tabulka 5: Závislost koncentrace roztoku TTC na kvalitě půdy .....	43
Tabulka 6: Kalibrační řada roztoků TPF.....	44
Tabulka 7: Složení Ashbyho mannitolového agaru.....	46
Tabulka 8: Optimalizace množství zálivky .....	49
Tabulka 9: Průměrný obsah aktivních látek v zálivkách používaných v experimentu.....	50
Tabulka 10: Průměrné hodnoty pH zálivek používaných v experimentu.....	51
Tabulka 11: Průměrné hodnoty elektrické vodivosti zálivek používaných v experimentu ..	51
Tabulka 12: Průměrné výsledné hodnoty stanovení DHA pro jednotlivé typy zálivek .....	52
Tabulka 13: Průměrné počty narostlých kolonií.....	55