



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 TRANSPORTU KAPALNÝCH
LIGNOHUMÁTŮ PŘES LISTY ROSTLIN
A ROSTLINNÉ KUTIKULY**

STUDY ON TRANSPORT OF LIQUID LIGNOHUMATES THROUGH PLANT LEAVES AND
PLANT CUTICLES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Eliška Rampáčková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1369/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Eliška Rampáčková**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Studium transportu kapalných lignohumátů přes listy rostlin a rostlinné kutikuly

Zadání diplomové práce:

- 1) vypracovat literární rešerši na téma studium transportu lignohumátů přes rostlinné listy resp. rostlinné kutikuly
- 1) provést optimalizační experimenty vedoucí k využití difúzních technik k požadovanému účelu
- 2) provést sérii vybraných experimentů s vybranými kutikulami a listy
- 3) diskutovat naměřené výsledky a vyvozovat logické závěry

Termín odevzdání diplomové práce: 10. 5. 2019

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

Bc. Eliška Rampáčková
student(ka)

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá studiem transportu roztoku komerčního lignohumátu draselného přes rostlinné kutikuly, jakožto hlavní bariéry při přenosu aktivní látky do tkáně rostlin. Zmíněná problematika byla zkoumána za účelem získání informací o schopnosti příjmu (transportu) kapalné aktivní látky rostlinou při foliárním hnojení. To se v posledních letech stává populární v oblasti efektivního využití hnojiv a snížení jejich negativních dopadů na životní prostředí.

Hlavním cílem byla optimalizace difúzních technik pro požadované účely ve Stokesových difúzních celách. Jakožto transportní bariéry byly použity rostlinné kutikuly izolované různými způsoby. Analytickou metodou pro stanovení transportovaného množství lignohumátu draselného byla ultrafialová a viditelná spektrometrie (UV-VIS) a ke zmíněným experimentům byly využity kutikuly bobkovišně lékařské a kutikuly plodů rajčete jedlého. Izolované kutikuly byly podrobeny analýzám pomocí optické mikroskopie, rastrovací elektronové mikroskopie a profilometrie. Neméně důležitou součástí předložené diplomové práce byla charakterizace použitého roztoku lignohumátu draselného, k čemuž bylo využito krom základních fyzikálně-chemických metod i metody pokročilejších např. tenziometrie, velikostně vylučovací chromatografie s detekcí UV a diferenčního refraktometru (SEC-UV-dRI) a termogravimetrie (TGA).

ABSTRACT

This thesis deals with the study of transport commercial solution of potassium lignohumate through the plant cuticles, as the main barriers in transport of active ingredient to plant tissues. The problematics has been studied to obtain the informations about ability of transport liquid active ingredient during foliar fertilization, which became popular in theme of effective utilization fertilizers and reduction their negative impact to environment.

The aim of this thesis was to optimize technics of diffusion for demanded purposes in the Stokes diffusion cells. As the transport barriers have been used the plant cuticles, that have been isolated by various methods. The ultraviolet and visible spectrometry (UV-VIS) was the analytical method for determination of transported volume of lignohumate and to the mentioned experiments the cuticles of *Prunus laurocerasus* and cuticles of tomato fruit have been used. The isolated cuticles have been analyzed by optical microscopy, scanning electron microscopy and profilometry. The characterisation of the used solution of lignohumate was also important part of this thesis. It has been used the basic physico-chemical methods and also the advanced methods as tensiometry, size exclusion chromatography with UV detector and differential refractive index detector (SEC-UV-dRI) and thermogravimetry (TGA).

KLÍČOVÁ SLOVA

humínové látky; rostlinné kutikuly; foliární hnojení; difúzní cely; lignohumát draselný

KEYWORDS

humic substances; cuticles; foliar fertilization; diffusion cells; potassium lignohumate

CITACE

RAMPÁČKOVÁ, Eliška. *Studium transportu kapalných lignohumátů přes listy rostlin a rostlinné kutikuly*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2019. 73 s. Vedoucí práce Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou 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 práce a děkana FCH VUT.

DECLARATION

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

.....

Eliška Rampáčková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu Ing. Jiřímu Smilkovi, PhD. za ochotné vedení a poskytnutí odborných rad k vypracování této diplomové práce. Velké díky patří mé konzultantce Ing. Marcele Smilkové za množství konzultací, cenné rady a čas, který mi při zpracovávání diplomové práce věnovala.

OBSAH

1 ÚVOD.....	7
2 CÍLE PRÁCE	8
3 TEORIE.....	9
3.1 Huminové látky.....	9
3.1.1 Vznik huminových látek	9
3.1.2 Vlastnosti huminových látek.....	10
3.1.3 Struktura huminových látek.....	11
3.1.4 Využití huminových látek.....	13
3.1.5 Lignohumát draselný	15
3.2 Struktura listu.....	16
3.2.1 Rostlinná kutikula	17
3.2.2 Kutikula bobkovišně lékařské.....	18
3.2.3 Kutikula plodu rajčete jedlého	19
3.3 Matematické modely difúze.....	20
3.3.1 Difúzní koeficient	22
3.3.2 Difúze přes rostlinné kutikuly.....	23
4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	26
4.1 Kvantifikace difúze přes kutikuly listů vs. slupku rajčete.....	26
4.2 Vliv přítomnosti stomat na průběh difúze	27
4.3 Vliv přítomnosti tenzidu v roztoku donoru na průběh difúze.....	28
4.4 Kvantifikace pomocí měření elektrického potenciálu	29
4.5 Určování permeability z Fickova zákona	32
4.6 Stanovení difúzního koeficientu KCl	33
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
5.1 Použité chemikálie.....	34
5.2 Použité přístroje a další zařízení	34
5.3 Separace rostlinných kutikul.....	35
5.3.1 Chemická metoda izolace kutikul	36
5.3.2 Enzymatická metoda izolace kutikul	37
5.4 Charakterizace izolovaných kutikul.....	38

5.4.1	Optická mikroskopie	38
5.4.2	Rastrovací elektronová mikroskopie.....	38
5.4.3	Profilometrie	39
5.5	Charakterizace roztoku Lignohumátu A.....	39
5.5.1	Tenziometrické měření roztoku LH.....	39
5.5.2	Měření vodivosti a pH roztoku LH.....	39
5.5.3	Termogravimetrická analýza roztoku LH.....	39
5.5.4	Analýza LH pomocí SEC-UV-dRI	40
5.6	Difúzní experimenty	41
5.6.1	Sestavení aparatury a využitá instrumentace pro měření difúze LH	41
5.6.2	Měření difúze KCl přes rostlinné kutikuly	44
5.7	Vyhodnocení difúzních experimentů.....	45
5.7.1	Určení konstanty difúzní cely β	45
5.7.2	Kalibrační řada lignohumátu draselného	48
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	50
6.1	Optická mikroskopie kutikul	50
6.2	Rastrovací elektronová mikroskopie kutikul	51
6.2.1	Detailní snímky kutikul bobkovišně ze SEM	51
6.2.2	Detailní snímky kutikul rajčete ze SEM	53
6.3	Profilometrické měření kutikul	54
6.4	Základní charakterizace lignohumátu draselného.....	56
6.4.1	Povrchové napětí roztoku LH	56
6.4.2	Vodivost a pH roztoku LH.....	56
6.4.3	Termogravimetrická analýza LH.....	56
6.4.4	Určení molekulární hmotnosti LH pomocí SEC-UV-dRI	57
6.5	Souhrn měření difúze KCl v horizontálních difúzních celách.....	59
6.6	Souhrn měření difúze LH v horizontálních difúzních celách	60
6.6.1	Výpočet difúzního koeficientu LH	60
7	ZÁVĚR.....	65
8	POUŽITÉ ZKRATKY	67
9	ZDROJE	68

1 ÚVOD

Foliární (listové) hnojení patří k jednomu z nejvyužívanějších způsobů konvenčního hnojení dnešní doby. Se stoupajícím zájmem o tekutá hnojiva rostou také nároky na ochranu životního prostředí, kam patří mimo jiné i minimalizace negativních dopadů používaných zemědělských přípravků na kontaminaci půd a podzemních zdrojů vody.

Předložená diplomová práce se zabývá optimalizací a následnou aplikovatelností jednoduchých transportních (transkutikulárních) experimentů simulujících přestup aktivních zemědělských přípravků přes rostlinné kutikuly izolované různými způsoby. Ke zmíněným experimentům byly využity Stokesovy difúzní cely. Díky těmto modelovým experimentům je možné regulovat koncentrace přípravků používaných při hnojení a stanovit tak, kolik látky je rostlina schopna efektivně pojmou transkutikulárním transportem a kolik látky je smyto a odplaveno do půdy či zdrojů vody.

Hlavním cílem diplomové práce je optimalizace jednoduchých difúzních experimentů přes rostlinné kutikuly. Ty hrají významnou roli v přirozené ochraně každé rostliny, neboť se jedná o hydrofobní voskovitý materiál, který reguluje transport vody, plynů a jiných aktivních látek a je klíčový pro transport kapalných hnojiv.

Pro realizaci transportních experimentů byly provedeny izolace kutikul z listů bobkovišně lékařské a z plodů rajčete jedlého. Pro izolaci byly využity dva typy metod, chemická a enzymatická. Studovaným transportním materiálem byly huminové látky, konkrétně se jednalo o komerční přípravek Lignohumát A (lignohumát draselný) od firmy Amagro s.r.o. a zároveň jako referenční přípravek byl používán roztok chloridu draselného. Lignohumát A byl zvolen z důvodů bohatých zkušeností a dlouholetého výzkumu, který na Fakultě chemické, Vysokého učení technického probíhá. Lignohumát draselný je charakteristický hnědým až hnědočerným zbarvením, což usnadnilo jeho detekci v horizontálních difúzních celách. Konkrétně byla využita ultrafialová a viditelná spektrometrie (UV-VIS).

Dalšími dílčími úkoly diplomové práce byla charakterizace použitých materiálů. Pro zjištění tloušťky kutikul a jejich drsnosti bylo využito mechanické profilometrie a pro zobrazení struktury kutikul byla využita optická mikroskopie a rastrovací elektronová mikroskopie. Tloušťka vrstvy a její povrch totiž hraje významnou roli v ovlivňování penetrace lignohumátu draselného přes kutikuly.

Lignohumát A byl rovněž charakterizován pomocí základních fyzikálně-chemických metod, jako jsou tenziometrie, velikostně vylučovací chromatografie s detekcí UV a diferenčním refraktometrem – SEC-UV-dRI) a termogravimetrie (TGA).

Cílem předložené vědecké práce je mimo jiné navrhnout nové možnosti měření penetrace látek do listů a sestavit tak model, kterým bude možné kontrolovat množství látek aplikovaných na rostliny a do půdy. Motivace této práce spočívá rovněž ve snižování negativních dopadů na znečištění pitných zdrojů vody a zároveň kontaminaci a přesolování úrodných půd. Navržená metoda v této práci může být jedním ze základů, které umožní další rozsáhlejší studie a řešení výše zmíněných problémů.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové bylo vypracovat literární rešerši na téma transportu aktivních látek přes listy resp. rostlinné kutikuly a na základě zpracovaných informací optimalizovat a následně efektivně využít difúzní techniky ke kvantitativnímu stanovení množství prošlého kapalného lignohumátu draselného, coby stimulatoru růstu, který je používán v kombinaci s jinými hnojivy a umocňuje jejich účinek.

Pilotní transportní experimenty přes izolované kutikuly *Prunus laurocerasus* (česky bobkovišeň lékařská) a kutikuly plodu *Solanum lycopersicum* (česky rajčete jedlého) byly provedeny v horizontálních difúzních celách (Stokesových celách). Transport Lignohumátu A byl měřen pomocí ultrafialové a viditelné spektrometrie. Dále bylo nutné sestavit vhodný matematický model pro stanovení difúzního parametru charakterizujícího míru transportu lignohumátu draselného skrze rostlinné kutikuly.

Za účelem objasnění rozdílů v jednotlivých transportních experimentech byla věnována pozornost také charakterizaci zmíněných kutikul a samotnému lignohumátu draselnému. Pro charakterizaci povrchu a struktury rostlinných kutikul bobkovišně a rajčete byla využita optická a rastrovací elektronová mikroskopie. Pro zjištění tloušťky kutikul byla použita mechanická profilometrie. Analyzován byl rovněž vzorek lignohumátu draselného, u něhož bylo provedeno termogravimetrické měření (TGA), tenziometrie za účelem zjištění povrchově aktivních vlastností nebo SEC-UV-dRI pro určení molekulové hmotnosti.

3 TEORIE

3.1 Huminové látky

Huminové látky (HL) představují hlavní složku organického původu v půdních prostředích. Jejich název je odvozený od termínu „humus“, čímž starověcí Římané obecně nazývali půdu. Později byl tento termín vyhrazen pouze pro organickou půdní hmotu. Základní definice humusu pochází z roku 1761 a pojednává o humusu jako o skupině odumřelých zbytků rostlin a organismů [1]. Organická hmota v půdě se dělí na dvě skupiny sloučenin, nehuminové látky (proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny, cukry a aminokyseliny) a huminové látky [2].

Od objevení huminových látek bylo provedeno mnoho výzkumů za účelem zkoumání původu, vzniku a struktury HL. Jedním z prvních vědců zabývajícím se tímto studiem byl Sprengel [3], který zkoumal pH huminových kyselin. O další pokrok se zasloužil švédský vědec Berzelius [4], kterému se podařilo izolovat dvě světle žluté huminové látky z minerální vody a bahna bohatého na oxidy železa. V roce 1930 byl zaveden pojem huminová hmota pro tmavě zbarvené vysokomolekulární organické koloidy, které zahrnovaly veškeré huminové látky. Nejvýznamnější pokrok v oblasti výzkumu HL byl uskutečněn až díky moderním fyzikálně-chemickým metodám. V roce 1968 byla poprvé proměřena fluorescence HL ve vodě. Později byly využity metody infračervené (IR) spektrometrie a ultrafialové a viditelné (UV-VIS) spektrometrie k zjištění zastoupení funkčních skupin v HL [5], [6], [7].

Co se týče struktury HL, existuje teorie, která podporuje skutečnost, že HL jsou polymery vznikající z jednoduchých sacharidů na základě reakcí redukujících cukrů s aminokyselinami. Tyto látky se podle zmíněného podrobí neenzymatické polymeraci za vzniku hnědého polymerního řetězce obsahující ve své struktuře atom dusíku [8]. Dnes uznávanou teorii uvádí Alessandro Piccolo [9], který popisuje HL jako komplexy supramolekulárních struktur produkované biochemickými rozkladnými procesy. Struktura makromolekul je udržována slabými vazebnými interakcemi a jejími hlavními komponentami jsou alifatické kyseliny, ethery, estery, alkoholy, aromatické deriváty ligninu, polysacharidy a polypeptidy.

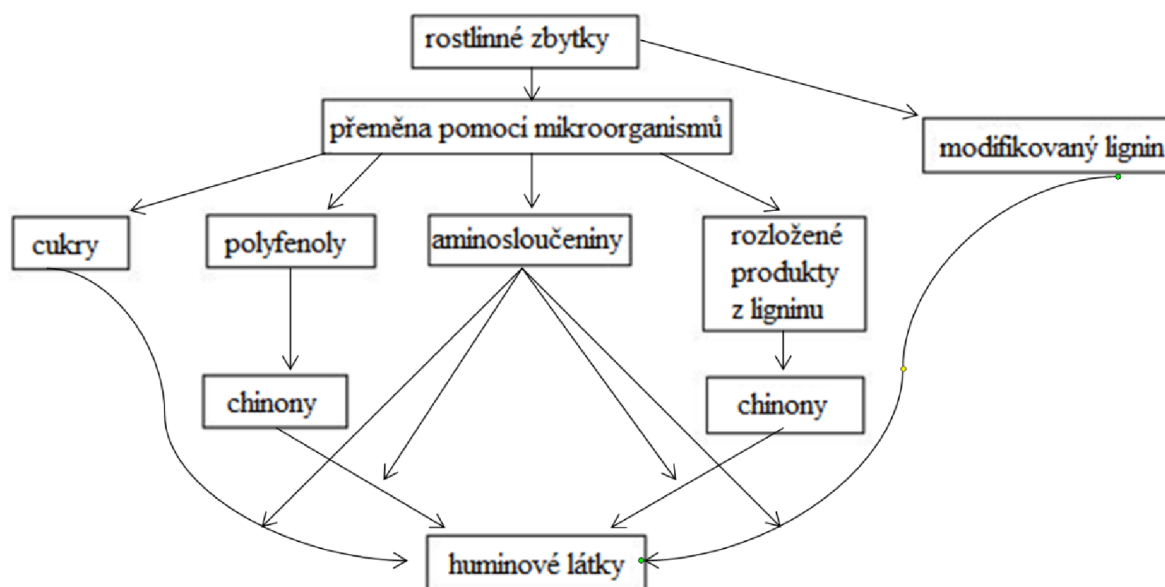
3.1.1 Vznik huminových látek

Přesný mechanismus vzniku HL nám stále není známý i přes mnohačetné publikace zabývající se tímto tématem. Ve schématu na Obr. 1 jsou zobrazeny čtyři obecně známé teorie vzniku HL.

První teorie byla popsána Waksmanem roku 1932 [10], který předpokládal, že hlavním zdrojem HL je lignin, který není zcela využit půdními mikroorganismy a podléhá řadě modifikací, například demetylací a následné oxidaci ligninu na chinony. Tyto sloučeniny jsou poté schopné zkondenzovat s aminosloučeninami a aamoníakem produkovaným mikroorganismy při rozkladných procesech. Výsledkem jsou první huminy (HU), huminové kyseliny (HK) a nakonec fulvinové kyseliny (FK). Roku 1988 byla Waksmanova teorie rozšířena o poznatek, že kromě ligninu tvoří HL další biopolymery jako cutin a suberin [5].

Maillardova teorie a polyfenolová teorie je popsána v práci Stevenson [11] a Haidera [12]. Maillardova teorie je založená na kondenzaci redukujících cukrů a amino sloučenin vznikajících jako produkty mikrobiálního metabolismu [5]. Nejuznávanější teorií

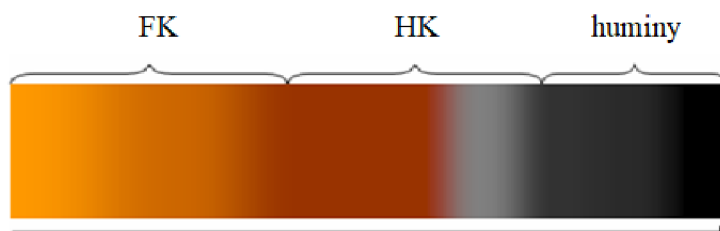
dnešní doby je polyfenolová teorie. Jak již z názvu vyplývá, hlavní roli při vzniku HL hrají polyfenoly. Základem je rozklad všech rostlinných biopolymerů, včetně ligninu, na jejich monomerní jednotky. Navázáním dalších jednotek, například glykosidů, taninů a produktů mikrobiálních syntéz vznikají polyfenoly. Působením enzymů se tyto organické látky mění na tzv. chinony, které podléhají polymeraci za vzniku huminových látek [11].



Obr. 1: Teorie vzniku huminových látek [5].

3.1.2 Vlastnosti huminových látek

Huminové látky lze rozdělit podle rozpustnosti na huminové kyseliny, fulvinové kyseliny a huminy [13]. HK jsou rozpustné v alkalickém prostředí a jsou tvořeny hydroxyfenoly, hydroxybenzoovou kyselinou a jinými aromatickými strukturami spojených s peptidy, aminosloučeninami a mastnými kyselinami. FK jsou sloučeniny rozpustné v alkalickém i kyselém prostředí a skládají se z fenolů a benzenkarboxylových kyselin. Jejich struktury jsou spojovány vodíkovými vazbami a také jsou schopny se vázat na polysacharidy. FK obsahují v porovnání s HK více kyslíku a kyselých funkčních skupin a méně uhlíku. HU představují nerozpustnou frakci v celém rozsahu pH (v kyselém i zásaditém prostředí) [14]. Rozdíl barevnosti tří skupin HL lze zaznamenat do schématu na Obr. 2 [15].



Obr. 2: Schéma barevnosti huminových látek [15].

Vlastnosti huminových látek se podle výzkumů odvíjí od vlastností biomasy, z níž jsou HL extrahovány. Montoneri [16] se ve své práci zabývá rozdílností huminových látek izolovaných z různě starého kompostu bio-odpadu. Z naměřených výsledků zjistil, že starší kompost obsahuje méně polysacharidů, ale je bohatší na lignin. Lignin je ve své struktuře charakteristický poměrem alifatických a aromatických uhlíkových řetězců a obsahem karboxylových a hydroxylových funkčních skupin. Struktura organických látek obsažených v kompostu je výchozí pro tvorbu huminových látek. Huminové kyseliny bývají izolovány z kompostu extrakcí pomocí alkalického činidla a precipitací při $\text{pH} < 1,5$. Kompost kromě huminových kyselin obsahuje další látky jako polysacharidy, proteiny a tuky [16].

3.1.3 Struktura huminových látek

Huminové látky jsou komplexní organické sloučeniny se složitou strukturou, jejichž výzkumem se zabývá mnoho vědeckých skupin. Nejběžnější metodou využívanou pro charakterizaci HL je elementární prvková analýza, která stanovuje distribuci esenciálních prvků, které HL obsahují (C, H, N, O, S) [5] (Tab. 1). Na základě naměřených dat, s výjimkou síry, která je obsažena v minimálním množství, bylo stanoveno poměrové zastoupení prvků pro huminové kyseliny $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}$ a pro fulvinové kyseliny $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_9\text{N}$. Přestože vzorce nejsou absolutní, jsou užitečné pro stanovení hranic pravděpodobné chemické struktury, kterou je možné určit jinými fyzikálně-chemickými metodami [5].

Pro určení kompletní struktury a jejich funkčních skupin se dále využívají metody nukleární magnetické rezonance (NMR) a infračervená spektrometrie (IR). Strukturální model HL obsahuje charakteristické hydrofobní alifatické řetězce, na něž se mohou vázat alifatické amidové a alkyletherové skupiny a hydrofilní hydroxylové a karboxylové funkční skupiny [15]. Zvláštní zřetel je brán při měření struktur HK a FK na určení počtu hydroxylových a karboxylových funkčních skupin, pro jejichž analýzu je využívána metoda potenciometrické titrace [16]. Funkční skupiny jsou vázány jak na aromatických jádrech, tak na postranních řetězcích HL. Průměrné zastoupení jednotlivých funkčních skupin v HK a FK udává Tab. 2 [17].

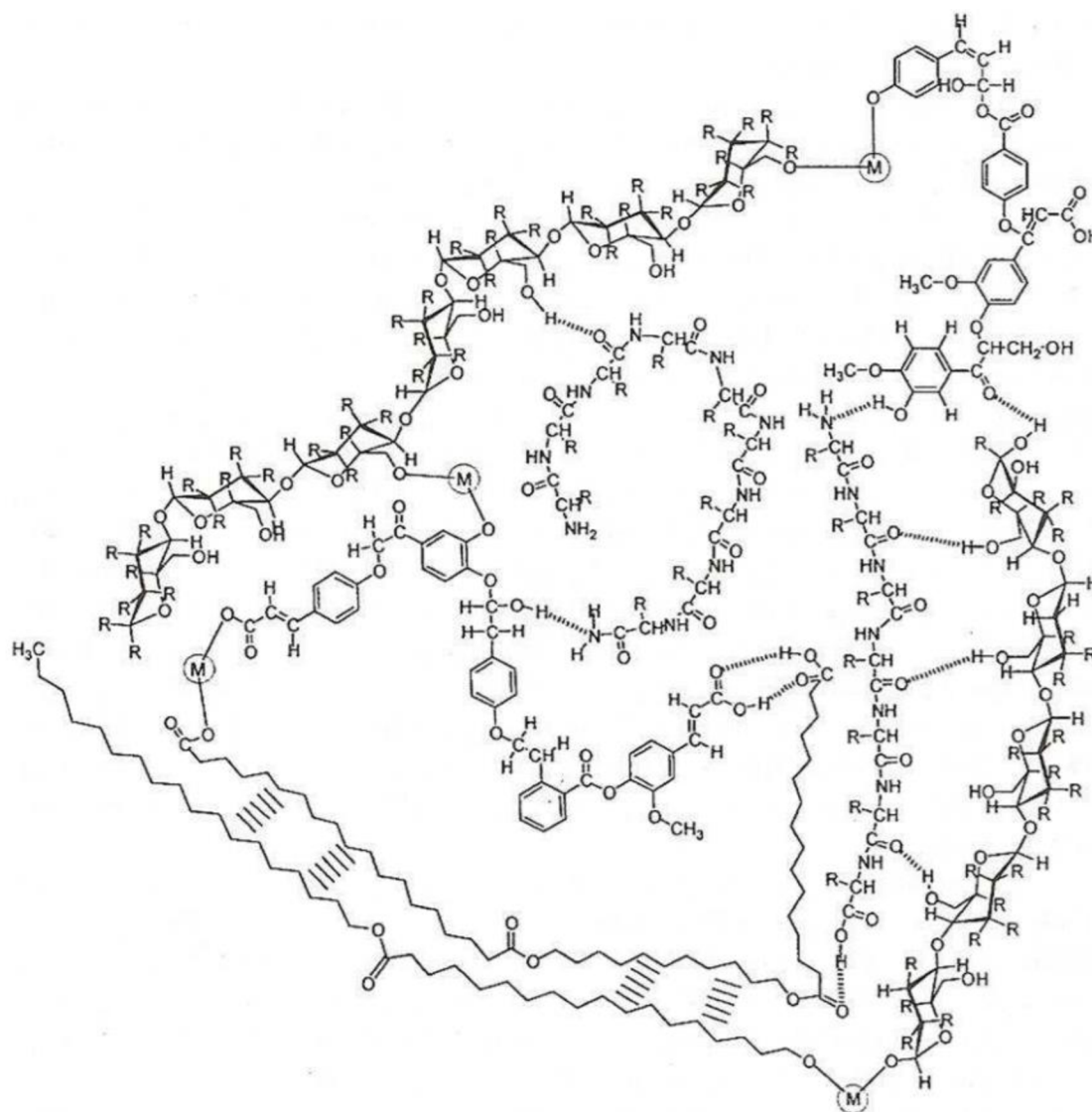
Tab. 1: Průměrné prvkové složení huminových kyselin (HK) a fulvinových kyselin (FK) vypočtené z naměřených hodnot obsahu prvků HK a FK v různých klimatických oblastech [5].

	prvek	průměr [hm. %]
HK	C	56,2
	H	4,7
	N	3,2
	S	0,8
	O	35,5
FK	C	45,7
	H	5,4
	N	2,1
	S	1,9
	O	44,8

Tab. 2: Průměrné zastoupení funkčních skupin v HK a FK v mmol/g [17].

Funkční skupiny	HK	FK
-COOH	4,4	2,1
-OH	3,3	3,9
-OH(-R)	1,9	4,0
-C=O	1,2	1,4
-O-CH ₃	0,3	0,4

Bylo navrženo mnoho struktur HK a FK, ale mělo by se na ně pohlížet jako na průměrné stavební modely, které mohou být obsaženy v reálných strukturách huminových látek. Příklad supramolekulárního modelu HK je na Obr. 3 [18].



Obr. 3: Strukturální model huminové kyseliny, kde M = kov [18].

Doplňující informace ke struktuře HL se dají stanovit i spektrometrickými metodami jako fluorescencenční a ultrafialová-viditelná spektrometrie (UV-VIS), infračervená spektrometrie (IR), nukleární magnetická rezonance (NMR), aj. UV-VIS spektra huminových a fulvinových

kyselin jsou nevýrazná, nevykazují dobře rozlišitelná absorpční maxima. Absorpce HL ultrafialového a viditelného světla huminovými látkami se zvyšuje se zvyšujícím se počtem kondenzovaných aromatických jader, s obsahem uhlíku, s molekulovou hmotností a s poměrem uhlíku v aromatických jádrech k uhlíku v alifatických řetězcích, což úzce souvisí s barevností HL [5].

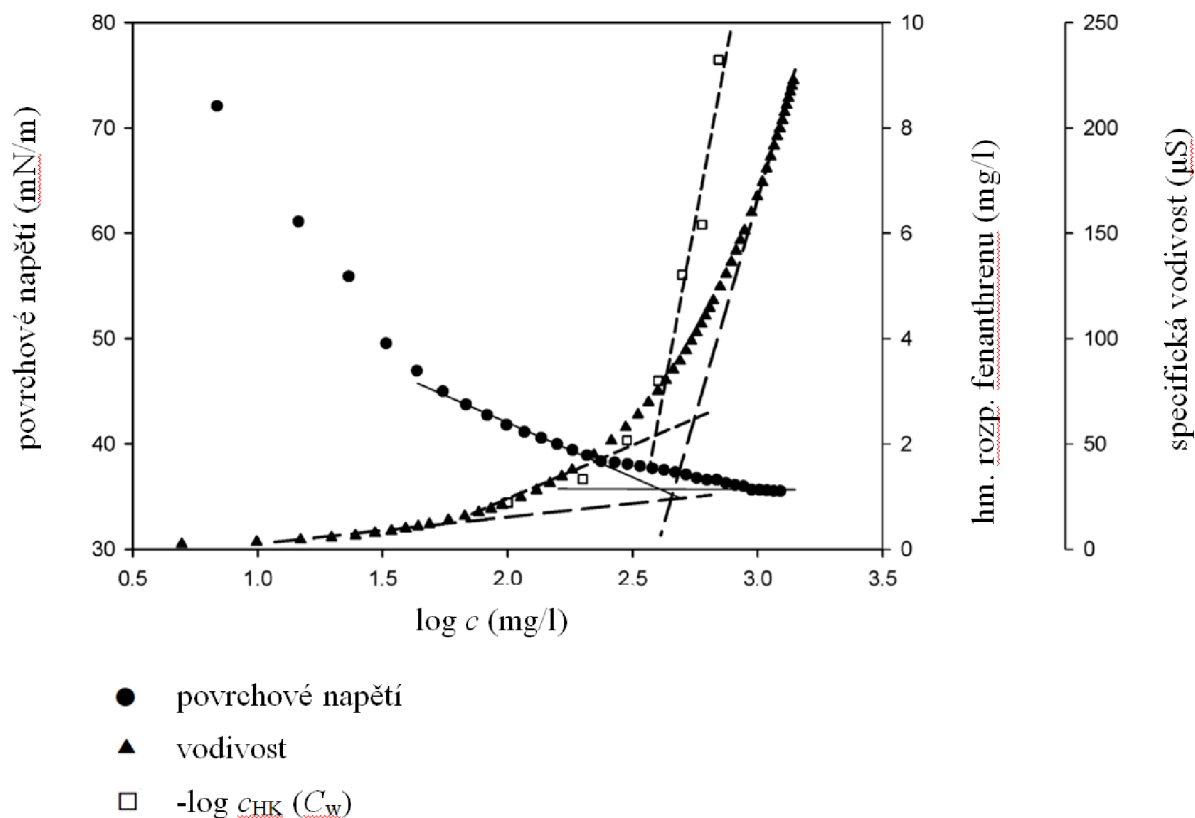
3.1.4 Využití huminových látek

Mnoho let se agrikulturní výzkum zabývá zvyšováním výtěžků plodin a klade menší důraz na jejich kvalitu nebo environmentální dopad. Za účelem zlepšení příjmu živin rostlinou a zmírnění dopadu na životní prostředí bylo zkoumáno mnoho chemických sloučenin, včetně huminových látek. Bylo dokázáno, že HL zlepšují růst a vývin rostlin a liší se od klasicky užívaných hnojiv. Při aplikaci HL do půdy, dochází ke stimulaci mikrobiální aktivity, zvýšení aktivity půdních enzymů a růstových stimulantů. Kromě jiného také zlepšuje efektivitu fotosyntézy, což zapříčiňuje akumulaci cukrů v ovoci, které je pak větší [19].

Značné množství vědeckých publikací se také zabývá schopností huminových látek snižovat povrchové napětí vody díky vytvoření hydrofobní vrstvy na rozhraní vody a vzduchu. Díky této vlastnosti mohou najít huminové látky využití i v jiných dosud neobjevených technologických aplikacích jako biosurfaktanty. Zpravidla platí, že se zvyšující se koncentrací HL v roztoku klesá povrchové napětí vody až do bodu kritické micelární koncentrace (CMC), kde s přidávkem koncentrace zůstává hodnota povrchového napětí neměnná a vzniká sraženina [19].

Agregační jevy jsou podle některých teorií sledovány z důvodu tvorby micel v roztoku. K vyřešení problému přispěli Guetzloff a Rice [20], kteří stanovili CMC ve vodném roztoku komerční HK měřením povrchového napětí a rozpustnosti hydrofobní sondy. Z jejich naměřených výsledků vyplynulo, že se zvyšující se koncentrací HK v roztoku klesá jeho povrchové napětí a roste rozpustnost sondy. CMC byla v tomto případě 7,4 g/l. Quagliotto [21] zpochybnil přesnost těchto výsledků a ve své práci ke stanovení CMC doporučil využít kromě měření rozpustnosti také určení vodivosti a povrchové aktivity roztoků. Ve vodném roztoku HK byl rozpouštěn hydrofobní fenanthren.

Ze závislostí vynesných v grafu na Obr. 4 byla určena hodnota kritické micelární koncentrace v bodě, kde se objevil prudký nárůst C_w , což je v tomto případě záporný logaritmus koncentrace HK v měřeném roztoku. Z poklesu povrchového napětí v závislosti na rostoucí koncentraci lze odvodit platnost tvrzení, že huminové kyseliny působí ve vodných roztocích jako surfaktanty [21].



Obr. 4: Závislost povrchového napětí, hmotnosti rozpuštěného fenanthrenu a specifické vodivosti na záporném logaritmu koncentrace huminové kyseliny ve vodném roztoku [21].

Velké využití v oblasti zemědělství našly také huminové kyseliny, ale jejich označení jako hnojivo se dá považovat za nepřesné. HK jsou efektivním doplňkem k syntetickým nebo organickým hnojivům, protože redukuje potřebné množství, které je nutné aplikovat za současného zachování stejného účinku. HK jako látky organického původu zlepšují kvalitu půdy díky schopnosti déle udržovat v půdě vodu a stimulovat aktivitu mikroorganismů, což zvyšuje produkci rostlinných enzymů potřebných k vývinu rostlin. Vědci také dokázali zvýšení výtěžku a kvality plodů, které obsahovaly více vitamínů [22].

Všeobecně známým faktem také je, že HK tvoří komplexy s těžkými kovy obsaženými v půdě a tak přispívají ke snížení půdní toxicity. Při sorpci kovových kationtů na HK dochází k iontové výměně a k vytvoření komplexů pomocí elektron-donorních funkčních skupin [23]. Výzkum sorpce iontů železa a kobaltu na HL provedli v rámci studie např. Fuentes [24] a Zhrebtsov [25].

Bylo také dokázáno, že HK vykazují léčebné a protizánětlivé účinky, proto našly uplatnění také v medicíně a kosmetice. Protizánětlivé účinky byly biochemicky podloženy na modelech humátu sodného či amonného [26]. HK jsou schopny bránit průniku infekce a toxinů do organismu díky vytvoření ochranného filmu na povrchu sliznice. Mimo to byly prokázány také účinky antivirové, antibakteriální, protiplísňové a analgetické (zmírňující bolest). Pro zvýšení léčebného účinku se HK dají používat také vnitřně [27].

3.1.5 Lignohumát draselný

Ke zpracování této diplomové práce byl jako zástupce přípravku obsahujícího huminové látky vybrán komerční Lignohumát A od firmy AMAGRO s.r.o., který je dodáván v práškové formě. Po rozpuštění v požadovaném množství vody či jiného obohaceného roztoku se využívá jako kapalné hnojivo aplikovatelné mimo jiné foliárně.

Lignohumát draselný byl připraven poprvé v roce 1991 v Austrálii firmou Omnia Specialities Australia a na trh se dostal později v roce 1993. Lignohumát vzniká z lignosulfonátu draselného, který patří do poslední generace výroby humátů. Lignosulfonát vzniká jako odpad při výrobě papíru. Řízeným procesem zrychlené humifikace je lignosulfonát převeden na lignohumát – směs HL zcela rozpustných ve vodě, které jsou z 90 % tvořené solemi HL, z nichž minimálně 50 % zastupují fulvinové kyseliny a nízkomolekulární látky. Kompletní rozpustnost umožňuje aplikaci na list a kombinaci s dalšími přípravky na ochranu a výživu rostlin [28].

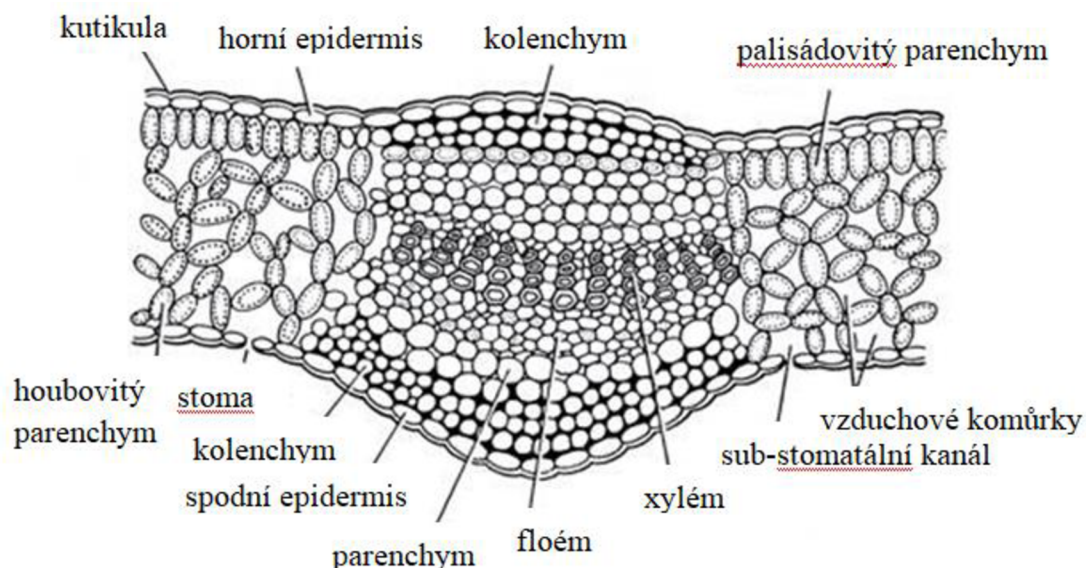
Výrobci Lignohumátu A z firmy AMAGRO svůj přípravek popisují jako směs s garantovaným množstvím fulvokyselin a dalších nízkomolekulárních částí huminového spektra s maximálně 50% obsahem solí huminových kyselin. Výrobek se řadí do skupiny označované anglicky jako „humic polycarboxyl acids“ a jeho pozitivní efekty se projevují nárůstem asimilační plochy, viditelněji lepší vitalitou rostlin, které efektivněji využívají dodávané živiny a jsou schopné rychlejší regenerace. Lignohumát draselný je výhodné dávkovat společně s dalšími listovými hnojivy [29].

3.2 Struktura listu

Předložené vědecká práce je zaměřená na penetraci aktivních látek přes rostlinné kutikuly, jakožto hlavní bariéry regulující transport aktivních látek (AL) do listů, a proto je tomuto tématu věnována jedna z hlavních kapitol. List (latinsky *folium*) je nepostradatelný orgán rostlin. Jeho primární funkcí je provádět fotosyntézu pomocí obsaženého chlorofylu a tak převádět sluneční energii na chemickou energii. Kromě asimilační funkce je důležitá také vegetativní funkce, která rostlině zajišťuje výměnu plynů, vody a jiných důležitých aktivních látek.

Listy jsou díky chlorofylu obvykle zelené barvy a mohou být při své tvarové rozmanitosti rozlišeny na plochou čepel a stopkovitý řapík. Je ho spodní část se člení na pochvu objímající stonek a palisty. Listová čepel je u většiny rostlin souměrná a na základě jejího tvaru se rozlišují druhy listů. Soubor cévních svazků na čepeli listu tvoří komplikovanou žilnatinu, která se sjednocuje v řapíku. U mnohých rostlin je řapík schopen otáčet čepel do výhodné polohy ke světlu [30]. Podle struktury jsou listy rozlišovány na monofaciální (izolaterální) listy, jejichž struktura je po obou stranách stejná, a bifaciální (dorzi-ventrální) listy s rozdílnou stavbou jejich horní a spodní strany [31].

Nejběžnější typ listu u dvouděložných rostlin je bifaciálního typu s rozdílně vyvinutou svrchní (adaxiální) a spodní (abaxiální) stranou čepele. Tyto listy obvykle rostou v horizontálním směru. Svrchní strana listu bývá více vystavována slunečnímu záření, proto bývá zpravidla svou stavbou odolnější než strana spodní, což se projevuje např. absencí stomat na horní kutikule a její větší tloušťkou. Na Obr. 5 je vidět detailní struktura průřezu klasickým bifaciálním listem, skládá se z mnoha pletiv, kde každé má svou funkci [31].

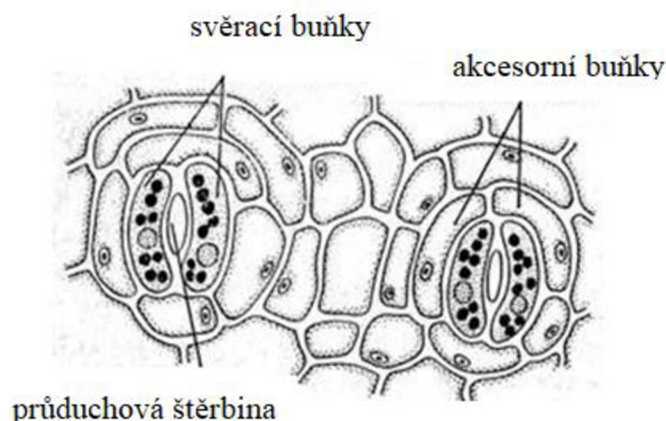


Obr. 5: Struktura bifaciálního listu v jeho průřezu [31].

Základní pletivo listu je mezofyl, který se u bifaciálního listu dále člení na svrchní palisádovitý parenchym a spodní houbový parenchym [30]. Typ pletiva s nepravidelně ztloustlými buněčnými stěnami nazýváme kolenchym [32]. Xylém a floém jsou systémy pletiv, které jsou součástí cévních svazků. Na povrchu listu je pokožka tvořená plochými

buňkami – epidermis, vnější stěna je krytá kutikulou. Součástí epidermis jsou průduchy (stoma), trichomy a papily.

Ve většině listů bifaciálního typu se stomata nachází na jejich spodní straně. Na horní straně buňky chybí úplně, nebo se vyskytují pouze v malém množství. Každé stoma je obklopeno dvěma svěracími buňkami, mezi nimiž se nachází tzv. průduchová štěrбина. Svěrací buňky obsahují chloroplasty a společně s vedlejšími (akcesorními) buňkami se účastní otevírání a zavírání stomat. Tento proces umožňuje regulovat transport vody a kontrolovat výměny plynů mezi rostlinou a vzduchem [31]. Popsané schéma stomat je uvedeno na Obr. 6.



Obr. 6: Struktura stomat [31].

Schopnost příjmu vody pomocí listů je využívána zemědělci při foliárním hnojení, které je založeno na rozpuštění účinné látky ve vodě a tento roztok je následně aplikován ve formě postřiků na povrch rostlin. K porozumění penetrace látky dovnitř listu je nutné dobře znát jeho morfologii, proto je velká část práce věnována rostlinným kutikulám (kap. 3.2.1), kde jsou popsány jejich vlastnosti.

3.2.1 Rostlinná kutikula

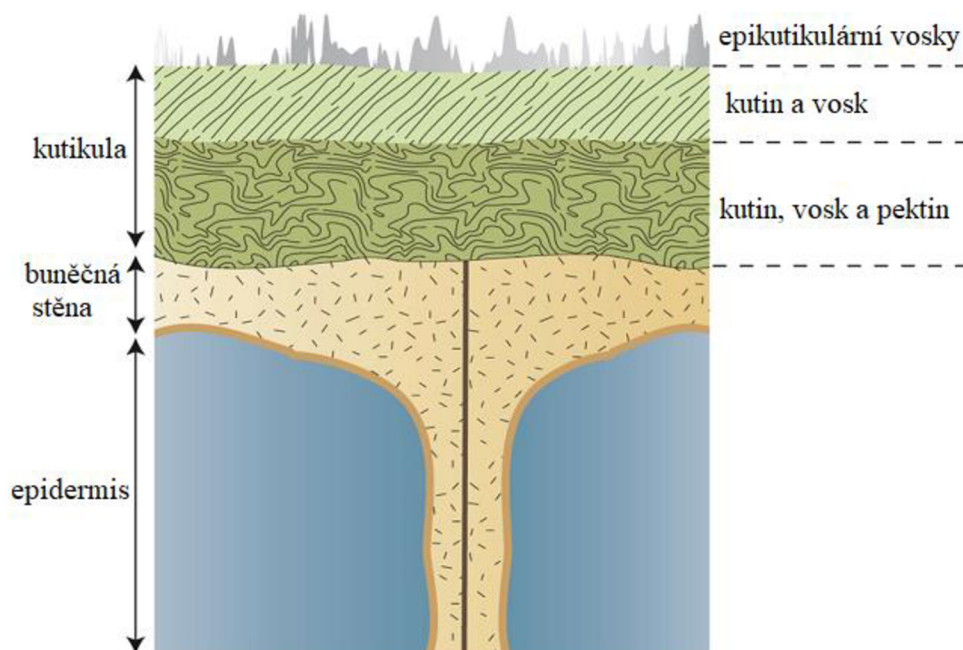
Rostlinná kutikula je vysoce organizovaný komplex, který tvoří vnější povrch nadzemních částí rostlin. Povaha kutikuly je studována se zřetelem na její funkci, neboť se jedná o první potenciální bariéru při průniku molekul aktivních látek. Charakter kutikuly je ovlivněn její heterogenní strukturou, která se navíc může lišit v rámci druhů rostlin, jejich genotypu, rostlinné fyziologii nebo v závislosti na stavu životního prostředí, ve kterém rostlina roste [33]. Zadržování a distribuci aktivní látky ovlivňují kromě jiného fyzikálně-chemické vlastnosti epikutikulárních vosků [34].

Tloušťka souvislé kutikulární vrstvy dosahuje 0,1 až 10 μm v závislosti na druhu rostliny. Vnější a vnitřní vrstva se liší svou strukturou a chemickým složením. Kutikula je tvořena dvěma látkami lipidového charakteru. Rámovou konstrukci membrány tvoří kutin, což je nerozpustný polyester hydroxy-mastných a hydroxyepoxy-mastných kyselin [34], v minimálním množství obsahuje také glycerol [35]. Monomerní jednotky kutinu vznikají biosyntézou v epidermálních buňkách. Po depolymerizaci kutinu, bývá v některých případech v kutikule obsažen zbytek alifatických uhlovodíků, který se nazývá kutan [36], který podle Deshmukha [37] obsahuje ve své struktuře vyšší obsah karboxylových, hydroxylových

funkčních skupin, vyšším stupněm krystalinity uhlovodíkových řetězců a esterových skupin přímo navázaných na benzenová jádra.

Další stavební komponentou kutikuly je rozpustný polymerizovaný alifatický vosk, který se vyskytuje na povrchu kutikuly včetně kutikulární matrix [34]. Kutikulární vosky jsou sloučeniny mastných kyselin, alkoholů, alkanů, esterů a triterpenoidů [38].

Protože kutikula je součástí epidermální buněčné stěny, jejími vnitřními stavebními jednotkami jsou také polysacharidy, zejména pektin a některé fenolové sloučeniny [39]. Podle modelu kutikuly na Obr. 7 je kutin zakotvený v řetězcích intrakutikulárních vosků, zatímco polysacharidy se nachází až ve vnitřní části kutikuly a jsou v kontaktu s buněčnou stěnou [40]. Stavba kutikuly je odlišná nejen pro různé druhy rostlin, ale také pro abaxiální a adaxiální stranu listů, které membrána pokrývá [41].



Obr. 7: Struktura kutikuly [41].

Kutikula může být popsána jako kompozitní membrána s asymetrickou vrstevnatou strukturou. Průběh difúze látek se odvíjí od dalších epidermálních znaků, jako jsou tvar, velikost buněk nebo přítomnost trichomů. Povrch listu může být různě strukturován, detaily mohou být dobře zkoumány rastrovacím elektronovým mikroskopem [42]. Experimentálně bylo stanoveno, že významnými faktory ovlivňující difúzi iontových sloučenin je struktura a tloušťka kutikuly, uspořádanost a hustota vodných pórů, druh rostliny, relativní vlhkost a iontová vazebná kapacita kutikuly [43].

3.2.2 Kutikula bobkovišně lékařské

Kutikuly listů bobkovišně lékařské (latinsky *Prunus laurocerasus*) byly izolovány za účelem studia na Fakultě chemické, kdy byly navrženy transkutikulární experimenty LH v kyvetách s hydrogely [15][44]. Pro účely studia transportu byl *P. laurocerasus* vybrán díky snadné izolaci kutikul a značným rozdílům adaxiální a abaxiální strany kutikul (přítomnost stomat pouze na abaxiální straně). K výzkumu vlastností kutikul významně přispěl Jetter [45], [46], který se zabýval zastoupením rozpustných kutikulárních vosků v kutikule bobkovišně.

Kutikulární vosky extrahoval pomocí chloroformu z čepele listů bobkovišně lékařské a ty podrobil analýze. Z výsledků jeho analýzy vyplývá, že horní i spodní kutikuly jsou tvořeny ze 72 hm. % alifatickými uhlovodíky o délce řetězce C₂₅ – C₃₃. Z 10 hm. % jsou zde zastoupeny kyselina oleanolová a ursolová, které řadíme mezi triterpenoidy a významné množství kutikuly tvoří primární alkoholy (9 hm. %), v malém množství jsou zde zastoupeny také aldehydy a mastné kyseliny. Po srovnání extrakce vosků z horní a spodní kutikuly bylo zjištěno, že chemické složení vrstev je stejné. Spodní kutikula však obsahuje větší relativní množství alkanů, než horní kutikula. S použitím různých metod extrakce vosků Jetter [45] dokázal, že se stavba vnější a vnitřní části kutikuly od sebe liší. Na rozdíl od epikutikulární vrstvy, skládající se zcela z alifatických uhlovodíků, je intrakutikulární vrstva tvořena z 63 hm. % z triterpenoidů.

3.2.3 Kutikula plodu rajčete jedlého

V diplomové práci byly využity listové kutikuly okrasné dřeviny bobkovišně lékařské, kvůli jejím vlastnostem a zkušenostem s jejich snadnou izolací a manipulací. Ovšem cílem je tuto optimalizovanou difúzní techniku využít pro široké spektrum kutikul z různých zdrojů, mimo jiné i pro zahradní plodiny (cibule, rajče, okurek, paprika apod.). Častým předmětem studia problematiky difúze přes rostlinné membrány se staly i kutikuly plodů rajčat [47]. Tyto kutikuly mají podobné chemické vlastnosti jako kutikuly listů, proto se využívají ke studiu penetrace aplikovaného roztoku s aktivní ingrediencí (AI) za účelem zlepšení jeho kvality.

Rajčatová kutikula představuje amorfni polymer, který se chová jako molekulární síto. Voda v tomto polymeru cirkuluje mezi vinutými řetězci uhlovodíků a hydroxylovými skupinami ukotvenými v polymerní matici [47]. Luque a spol. [48] se ve své práci zabýval charakterizací kutikul rajčat ve dvou stádiích zralosti a stanovil jejich chemické složení v procentech (Tab. 3).

Luque zjistil, že hlavní složkou kutikul rajčat je kutin (> 72 %), který je ve své struktuře z 80 % hmotnosti tvořen monomerem zvaným 10,16-dihydroxyhexadekanová kyselina. Druhou podstatnou složkou rajčatové kutikuly jsou sloučeniny schopné hydrolyzy (přibližně 20 %). Jedna z dalších důležitých složek, které významně ovlivňují kutikulární permeabilitu, je množství vosku, který pokrývá vnější povrch kutikuly a tvoří asi 4 % její hmotnosti. V transportu vody kutikulou hrají důležitou roli také flavonoidy přítomné v polymerní matici mezi řetězci uhlovodíků. Pravděpodobně tvoří klastry a tím blokují transportní cesty. Je známo, že kutikuly různých druhů rostlin obsahují flavonoidy o odlišné struktuře [48].

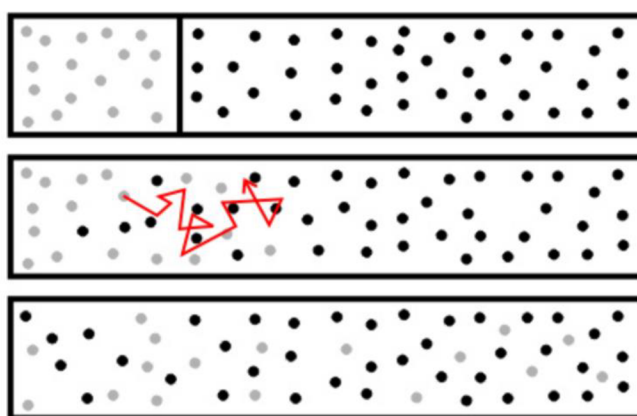
Tab. 3: Procentuální obsah kutikuly plodu rajčete [48].

charakteristika [hm. %]	stádium zralosti	
	zelený nezralý plod	zralý plod
vosky	3,93	4,81
sloučeniny schopné hydrolyzy	20,11	22,55
kutin	75,95	72,64
flavonoidy	neidentifikovány	naringenin a chalconaringenin

3.3 Matematické modely difúze

Základním transportním jevem při příjmu aktivní látky rostlinou je difúze. Je důležité zde zmínit příslušné fyzikální vztahy k pozdější kvantifikaci transportované AI přes rostlinnou kutikulu. V rámci problematiky difúze molekul přes rostlinné tkáně bylo popsáno již mnoho matematických modelů [49], [50], [51].

Difúze je proces, pomocí něhož je hmota v makroskopicky nehybném uzavřeném systému transportována z jedné části systému do jiné zcela náhodným pohybem molekul. Podstata spontánní síly rozptylu částic v nehomogenním prostředí z hlediska termodynamiky spočívá v tom, že chemický systém vždy spěje do stavu s nejnižší vnitřní energií [52]. Proces difúze je schematicky znázorněn na Obr. 8. V případě roztoku dochází k difúzi rozpuštěné látky i rozpouštědla společně, proces je označován jako *binární difúze*.



Obr. 8: Příklad difúze s naznačením Brownova pohybu [53].

Adolf Eugen Fick [54] byl prvním vědcem zabývajícím se difúzními procesy. V roce 1855 navrhl matematický model pro popis difúzních procesů na základě analogie difúze s procesy vedení tepla. Definoval celkový jednorozměrný *difúzní tok* J :

$$J = A \cdot j = A \cdot D \cdot \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{A}{A}, \quad (1)$$

kde Q značí množství materiálu, které projde přes kolmou plochu A za jednotku času t . D označuje difúzní koeficient a j představuje difúzní tok. Difúzní tok, neboli rychlost změny poměru prošlého materiálu ku ploše je definován v $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$. Obecně je jednorozměrný difúzní tok skrz kolmou plochu vyjádřen *Fickovým zákonem*, který říká, že pohyb molekul se děje směrem klesající koncentrace a závisí na koncentračním gradientu v daném místě a čase:

$$J = -D_i \frac{\partial c_i}{\partial x}, \quad (2)$$

kde J je již zmiňovaný difúzní tok, D_i je difúzní koeficient ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), c představuje koncentraci ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$), x je vzdálenost (m) a $\partial c_i / \partial x$ ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-4}$) vyjadřuje parciální derivaci změny koncentrace v souřadnicích x .

Hodnoty difúzních koeficientů u plynů jsou kolem $10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, ve vodném prostředí se difúzní koeficienty pro malé a středně velké molekuly pohybují v hodnotách $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a pro makromolekuly v řádu $10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Extrémně pomalá je difúze v tuhých látkách, kde je D řádově $10^{-20} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [55].

První Fickův zákon udává změnu koncentrace difundující látky podle souřadnice x . Předpokladem pro platnost tohoto zákona je jednodimenzionální difúze ve směru x -ové osy a neměnný koncentrační gradient v průběhu času [52]. U většiny difúzních procesů však k časové změně koncentrace dochází. Změnu koncentrace v závislosti na čase při nestacionární difúzi vyjadřuje tzv. 2. Fickův zákon:

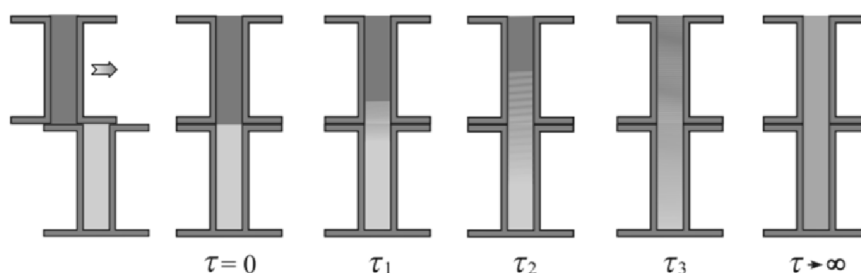
$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{1}{A} \cdot \frac{\partial A}{\partial x} \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \right), \quad (3)$$

tento vztah platí tehdy, pokud je difúzní koeficient nezávislý na koncentraci. V případě neměnné plochy A , bude rovnice (3) zjednodušena do tvaru (4).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right). \quad (4)$$

Rovnice (4) je diferenciální rovnice druhého řádu vzhledem k prostorové souřadnici a prvního řádu vzhledem k času. Jejím řešením dostaneme koncentraci jako funkci místa a času. Pro řešení je nutno zvolit vhodné okrajové a počáteční podmínky, tj. zvolit vhodný model. Vzhledem k tomu, že difúzní procesy jsou značně závislé na okolních podmínkách, musí být každý případ řešen zvlášť [52]. Přehled difúzních modelů je nabízen v referenci [56].

Průběh nestacionární difúze může být ilustrován Obr. 9, který znázorňuje měření difúzního koeficientu metodou volné difúze. Roztok v horní části kyvety se posunutím ve směru šipky uvede do styku s čistým rozpouštědlem, čímž se vytvoří koncentrační rozhraní. V průběhu difúze se rozhraní rozplývá, dokud se koncentrace nevyrovnají [55].



Obr. 9: Příklad nestacionární difúze [55].

Jednodušším modelem, zvažující tok jednotkou plochy, je množství rozpouštědla difundující přes jednotku plochy v čase:

$$J = \frac{n}{A \cdot t}, \quad (5)$$

kde n je množství rozpouštědla (mol), A je plocha, přes kterou probíhá difúze (m^2) a t je čas (s). Příjem látek jednotkou plochy U ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$) v určitém čase může být určen podle vztahu [2]:

$$U = J \cdot t = \frac{M}{A} = D \cdot t \cdot \frac{\partial c}{\partial x}. \quad (6)$$

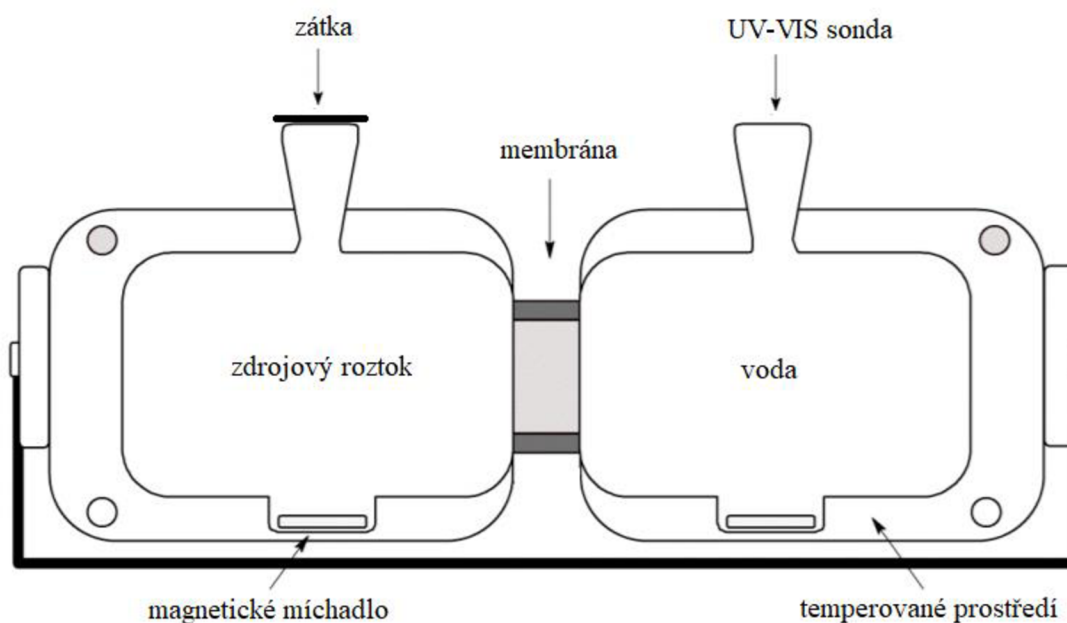
3.3.1 Difúzní koeficient

Jak již bylo zmíněno výše, difúzní koeficient přímo úměrný difúznímu toku. Nejběžnější rovnicí pro stanovení difúzního koeficientu je Stokesův-Einsteinův zákon, který je platný pouze pro částice kulovitého tvaru. Jeho znění je:

$$D = \frac{k_B T}{f} = \frac{k_B T}{6\pi\mu R_0}, \quad (7)$$

kde f představuje frikční koeficient, k_B je Boltzmannova konstanta, μ značí viskozitu systému, R_0 je poloměr difundující látky a T představuje termodynamickou teplotu.

Pravděpodobně jedním z nejlepších nástrojů pro stanovení difúzních koeficientů v plynech či kapalinách při difúzi skrz membránu je Stokesova diafragmová cela. Uspořádání difúzní cely může být horizontální či vertikální a vždy se skládá ze dvou komor, oddělených přepážkou ve formě membrány. Schematicky znázorněné uspořádání horizontální cely je na Obr. 10. Jedna z komor je naplněna difundující látkou o vyšší koncentraci, druhá část difúzní cely je naplněna vodou či roztokem difundující látky o nižší koncentraci.



Obr. 10: Schématické znázornění difúzní cely v horizontálním uspořádání [52].

Za předpokladu, že difundující látka je schopna absorbovat záření v UV-VIS oblasti, je difúzní koeficient možné určit měřením UV-VIS spektra v přijímací cele a zjištěním časové závislosti vývoje koncentrace zvolené difúzní sondy. Změna koncentrace může být měřena

také metodou konduktometrie, kdy je měřena difúze chloridu draselného coby standardu. V případě difúze přes membránu v difúzní cele lze difúzní koeficient D vypočítat ze vztahu [57]:

$$D = \frac{1}{\beta t} \ln \left[\frac{(c_{1,z} - c_{1,p})_t}{(c_{1,z} - c_{1,p})_0} \right], \quad (8)$$

kde t symbolizuje čas experimentu, v čitateli výrazu je za přirozeným logaritmem rozdíl koncentrací v obou částech difúzní cely na počátku experimentu v čase 0 a ve jmenovateli je rozdíl koncentrací v čase t . β je tzv. konstanta difúzní cely, kterou lze vypočítat pomocí rovnice:

$$\beta = \frac{A}{l} \ln \left(\frac{1}{V_p} + \frac{1}{V_z} \right), \quad (9)$$

kde A je plocha, přes kterou probíhá difúze, l je efektivní tloušťka membrány, V je objem difúzní cely v přijímací a zdrojové komoře. Konstanta β musí být experimentálně stanovena použitím difúzního materiálu, jehož difuzivita je dobře známa [57].

3.3.2 Difúze přes rostlinné kutikuly

Rostlina přijímá AI pomocí listů specificky v závislosti na vlastnostech aplikované látky a na stavbě kutikuly. V této kapitole jsou shrnuty faktory, které ovlivňují transportní procesy, probíhající při foliárním hnojení.

Fickův zákon byl modifikován pro listové kutikuly do vztahu pro výpočet difúzního toku J :

$$J = D \cdot \frac{K_0 C_0 - K_i C_i}{lx}, \quad (10)$$

výraz $K_0 C_0 - K_i C_i$ reprezentuje hnací sílu difúze. K_0 je koeficient rozdělení mezi zbytkem na povrchu listu a na kutikule. K_i je koeficient rozdělení mezi kutikulou a vodnou fází epidermální buněčné stěny, C_0 je koncentrace AI na povrchu listu a C_i je koncentrace AI v kutikule. Člen l reprezentuje efektivní kutikulární tloušťku, která může být větší než zdánlivá nebo měřená tloušťka x . Z daného vztahu je pak snadné určit množství AI v roztoku donoru a akceptoru rozdělené kutikulou a dokonce množství, které je nasorbováno uvnitř kutikuly [58].

Rostlina přijímá aktivní látky dvěma možnými mechanismy – kutikulárním a stomatálním. Přítomnost stomat značně ovlivňuje rychlost příjmu AI z roztoku, jejich role v problematice foliárního hnojení je však v mnoha studiích diskutována sporně [56]. Agrochemikálie mohou být hydrofilního nebo lipofilního charakteru. Podle ochoty reagovat s vodou má jejich transport rostlinou odlišný průběh. Tento poznatek podporuje teorii, že různé typy sloučenin přechází přes kutikulu různou cestou [43].

Hydrofilní sloučeniny difundují kutikulou přes polární póry. Tyto sloučeniny mohou být dvojího typu – iontové a nenabitě. Iontové sloučeniny se po průchodu vodným pórem rozdělí na kladné a záporné ionty, ty musí penetrovat ve stejném poměru, aby byla udržena elektroneutralita. Mezi tyto sloučeniny řadíme rostlinné hormony, živiny jako např. CaCl_2 , pesticidy nebo glykofosfáty.

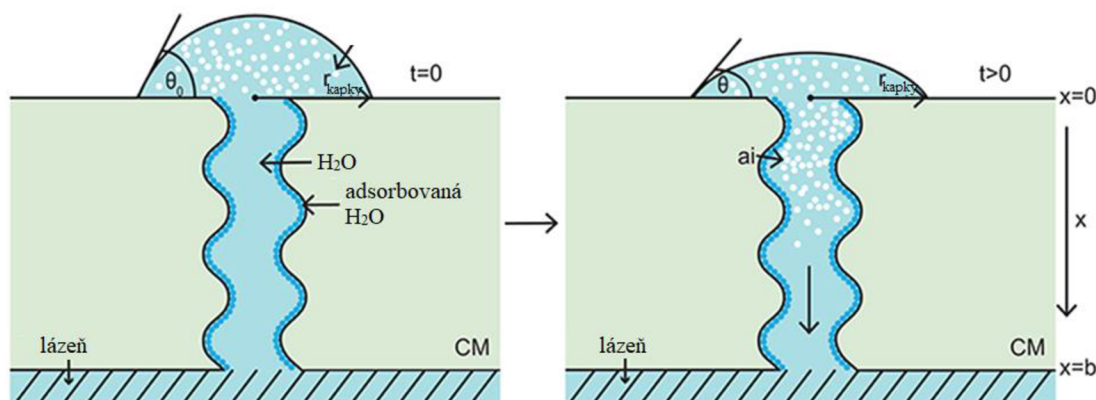
Voda jako malá nenabitá molekula může prostupovat jak hydrofilní, tak lipofilní cestou. Obsah vody v kutikule se zvyšuje s relativní vlhkostí, která způsobuje botnění kutikuly. Na základě tohoto zjištění můžeme usuzovat, že penetrace AI závisí na vlhkosti. Relativní vlhkost má také dopad na rychlost odpařování aplikovaných kapek na povrch kutikuly, což také ovlivňuje průchod látek. Časová závislost botnění kutikuly zatím není známa [43].

Vodné póry jsou nanostruktury dočasně tvořené pouze v přítomnosti vody. Kutikula je kromě kutinu tvořena dalšími polárními polymery, které v přítomnosti vody botnají a vytvářejí póry o velikostech jednotek nanometrů [43].

Při měření difúze přes rostlinnou kutikulu je třeba brát v úvahu, že se malé množství AI sorbuje na kutikulu. Stomata přítomná na kutikulách fungují jako vstupní brána pro transport látek přes spojovací cesty mezi povrchem listu a mezofylem. Před samotným procesem difúze však dochází k adsorpci molekul hydrofilní kapaliny na povrch stěn stomat [60].

Stanovením matematického modelu průběhu difúze přes rostlinné kutikuly, do něhož byla zahrnuta také adsorpce AI na povrchu kutikuly se zabýval Kraemer [61] a Tredenick [43]. Povrch kutikuly popsali jako nelineární pórovitý systém. Příklad jednoho póru je schematicky znázorněn na Obr. 11. Zde je možné pozorovat, že dochází zároveň k difúzi vody i AI, levá část obrázku značí počátek difúze, na pravé straně je vidět průběh procesu po krátkém čase.

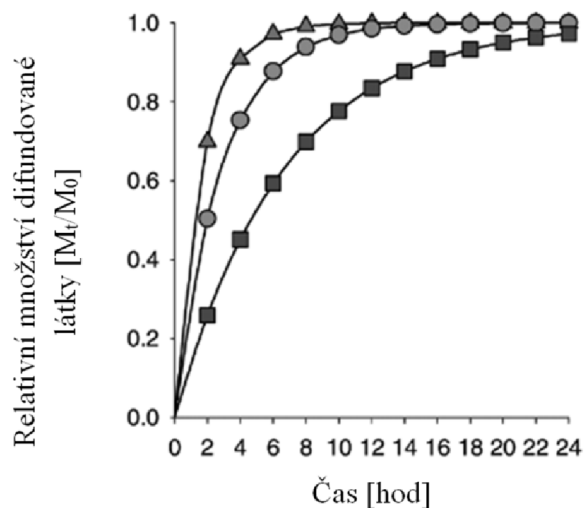
Difúze AI začíná na povrchu kutikuly, následně dochází k transportu AI přes póry kutikuly do míchané vodní lázně. Tmavě modré body na povrchu póru znázorňují adsorbované molekuly vody. Limitující faktor v průběhu difúze je tedy porozita membrány. Voda umožňuje difúzi AI botněním kutikuly a otevírá tak vodné póry, přes které difunduje AI. Molekuly, které se adsorbují na povrchu membrány, už nejsou dále schopné difundovat [43].



Obr. 11: Znázornění adsorpce molekul na póry kutikuly [43].

Základní podmínkou difúze přes jakoukoliv bariéru je existence koncentračního gradientu. Množství difundovaných kutikul je přímo úměrné velikosti koncentračního gradientu na obou stranách membrány. Z kinetického hlediska je transport, popisující příjem hnojiv

v zemědělství, řízen nelineárním modelem difúze, která má tvar saturační křivky. Rychlost nelineární difúze v závislosti na koncentračním gradientu je znázorněna na Obr. 12. Po rychlé počáteční rychlosti příjmu se rychlost snižuje v čase, dokud nedosáhne ustáleného stavu. Křivky mohou znázorňovat jiné typy AI aplikovaných na stejné kutikuly ve stejném objemu. Ustáleného stavu, zde 100% příjem, dosáhnou v různých časech [47].



Obr. 12: Znázornění průběhu nelineární difúze [47].

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Za účelem studia problematiky difúze přes listové kutikuly bylo publikováno mnoho studií. Problematika transportních jevů přes rostlinné membrány je zájmovou oblastí mnohých vědeckých skupin po celém světě zejména kvůli kvantifikaci molekul aktivních ingrediencí (AI) aplikovaných na rostliny za účelem zlepšení výnosů a kvality plodin. Postup a výsledky zmíněných prací slouží jako výstup pro tuto diplomovou práci.

Mnoho studií pracuje s izolovanými kutikulami, protože ve většině případů jsou výsledky stejné jako při práci s neporušenými listy [47]. Je třeba rozlišovat adaxiální a abaxiální strany kutikul. V praxi se setkáváme zejména s bifaciálními listy, tedy s takovými, kdy je struktura horní a spodní strany odlišná. Průběh difúze se pak liší v závislosti na chemickém složení kutikul či na množství stomat, apod.

Nejčastější metody pro studium a kvantifikaci transportu jsou metody rádiového značení, které jsou hojně používány především díky nízkým detekčním limitům. Další alternativou mohou být analytické spektrofotometrické metody (např. UV-VIS) [47], které mohou být využity pro měření difúze AI, které vykazují absorpci záření v oblasti 200–900 nm, jednoduše řečeno, jejich roztoky vykazují barevnost.

4.1 Kvantifikace difúze přes kutikuly listů vs. slupku rajčete

Zeisler-Diehl s kol. [47] se ve své práci věnoval studiu kinetiky a kvantitativnímu stanovení transportu látek přes izolované kutikuly, které byly upevněny mezi dvě transportní komory, z nichž jedna obsahovala roztok AI a druhá neionizovanou vodu. Měření probíhalo metodou rádiového značení, která má výhodu nízkých detekčních limitů.

V článku ověřovali platnost tzv. „*hold-up*“ času, což je čas mezi prvním kontaktem molekuly zdrojového roztoku s membránou a časem detekce molekuly v přijímacím roztoku. Tento parametr se mění v závislosti na typu membrány, přes kterou difúze probíhá. Konkrétně kutikuly mají určitou sorpční kapacitu, proto při difúzi musí dojít nejprve k ustálení rovnovážné koncentrace molekul v kutikule, než může být detekována koncentrace AI v přijímací komoře. Voda, jako malá polární molekula, má sorpční schopnost na lipofilní kutikulu nízkou, proto je i „*hold-up*“ při její difúzi krátký [47].

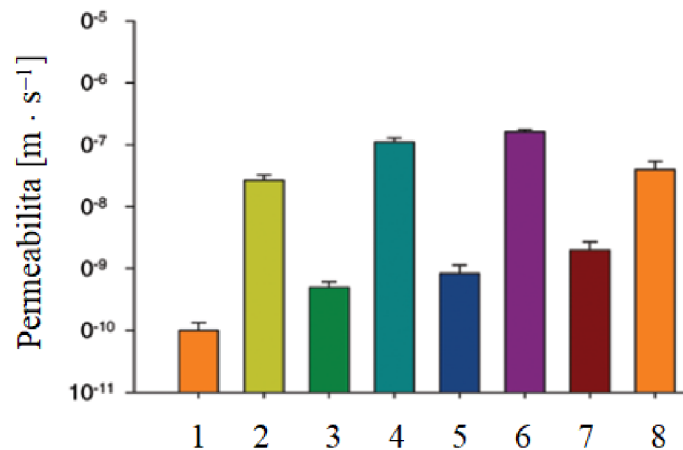
Propustnost byla kvantifikována na kutikulách listů břečťanu, citrusu, hrušně a slupky rajčete dle vztahu:

$$P = \frac{F}{A \cdot \Delta c}, \quad (11)$$

kde P značí permeabilitu v $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, F je tok v $\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$, A je plocha, přes kterou transport probíhá v m^2 a Δc značí koncentrační gradient v $\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$. Propustnost kutikuly plodu rajčete byla dvacetkrát větší než kutikuly listu břečťanu. Důvodem jsou podle autorů rozdíly ve struktuře kutikul. Bylo navrženo, že polární molekuly (zde konkrétně voda) prostupuje kutikulou pomocí polárních pórů, které prochází vnitřní buněčnou stěnou přes vrstvu kutinu a ústí na opačné straně kutikuly. Přítomnost a množství takových polárních cest jsou pak pro každou kutikulu různé. Permeabilita je uvedena v jednotkách $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, což má jednoduše

naznačit rychlost transportu přes kutikulu. Ve své podstatě však je zde na permeabilitu pohlíženo jako na parametr, který byl získán násobkem rozdělovacího a difúzního koeficientu, poděleným tloušťkou kutikuly. Data byla pro názornost a porovnání vynesena do grafu (Obr. 13) [47].

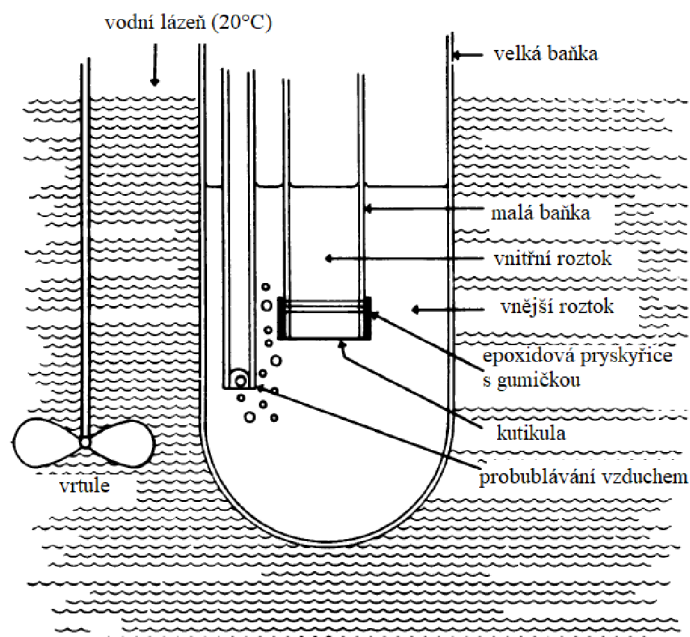
Dále byl sledován vliv extrakce kutikulárního vosku z povrchu kutikul a z výsledků vyplývalo, že molekuly procházely přes kutikuly zbavené vosku, až tisíckrát rychleji [47].



Obr. 13: Permeabilita pro různé kutikuly (1 – kutikula břečťanu, 2 – kutikula břečťanu bez vosku, 3 – kutikula hrušky, 4 – kutikula hrušky bez vosku, 5 – kutikula citrusu, 6 – kutikula citrusu bez vosku, 7 – kutikula rajčete, 8 – kutikula rajčete bez vosku) [47].

4.2 Vliv přítomnosti stomat na průběh difúze

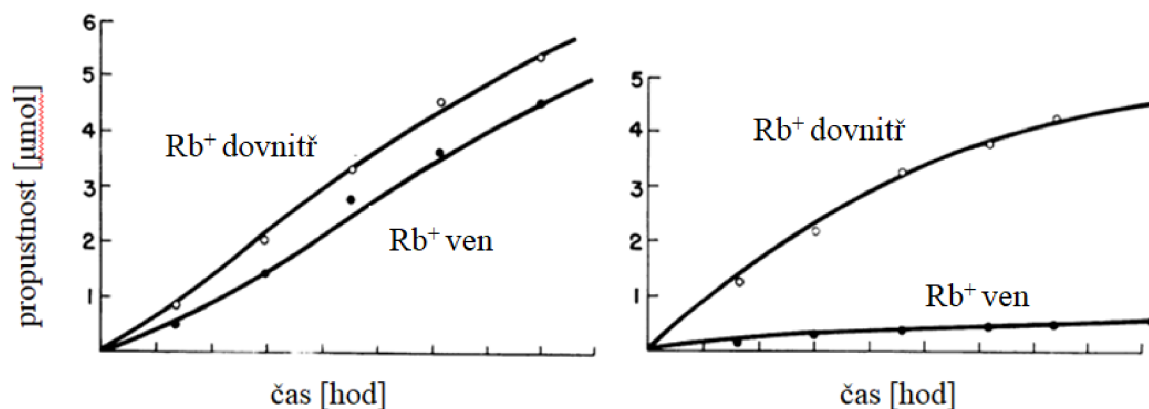
Příjem iontových agrochemikálií listem závisí na permeabilitě kutikuly pro kationty a anionty. Yamada [60] se zabýval stanovením rychlosti penetrace iontů přes enzymaticky izolované kutikuly listu rajčete a cibule a to z abaxiální i adaxiální strany listu. Pro výzkum byly vybrány tyto rostliny, protože se odlišují svojí strukturou. Kutikula listu rajčete neobsahuje stomata na rozdíl od kutikuly listu cibule. Připravená aparatura je zobrazena na Obr. 14.



Obr. 14: Aparatura pro měření permeability iontů přes kutikuly [60].

Celá aparatura byla ponořena do vodní lázně o stálé teplotě. Vnější baňka byla naplněna neionizovanou vodou a do ní byla ponořena malá baňka s roztokem radioizotopů $\text{Ca}^{45}\text{Cl}_2$, Rb^{86}Cl , $\text{FeS}^{35}\text{O}_4$ nebo RbCl^{36} , na které byla epoxidovou pryskyřicí a gumičkou připevněna kutikula. Roztok byl do baňky dávkován při současném ponořování baňky, aby se vyrovnal hydrostatický tlak a nedošlo k poškození kutikuly. Rychlost penetrace byla stanovena měřením radioaktivity v 1 ml vnějšího roztoku [60].

Bez ohledu na typ kutikuly docházelo k penetraci iontů nezávisle na tom, zda kutikula obsahovala stomata či nikoliv. Zároveň bylo zjištěno, že jak pro kutikuly listů rajčete, tak cibule, byla rychlejší difúze ve směru od vnější k vnitřní straně, než z vnitřní k vnější. Rozdíly byly zaznamenány v propuštěném látkovém množství aktivní látky. Na Obr. 15 je vidět srovnání propustnosti listových kutikul cibule a rajčete v obou směrech. Větší rozdílnost je vidět v propustnosti rajčete právě z důvodu absence stomat. Kutikula se stomaty má větší absorpční povrch, je tenčí a má jinou strukturu [60].



Obr. 15: Závislost propustnosti iontů Rb^+ přes listové kutikuly cibule (vlevo) a rajčete (vpravo) [60].

4.3 Vliv přítomnosti tenzidu v roztoku donoru na průběh difúze

Kraemer [61] se také věnoval studiu penetrace aktivní látky, konkrétně vápenatých solí, z roztoku přes enzymaticky izolované slupky rajčat. Motivací pro jejich výzkum byl vliv vápníku na stabilitu buněčných stěn rostlin, jejich stárnutí a zrání ovoce.

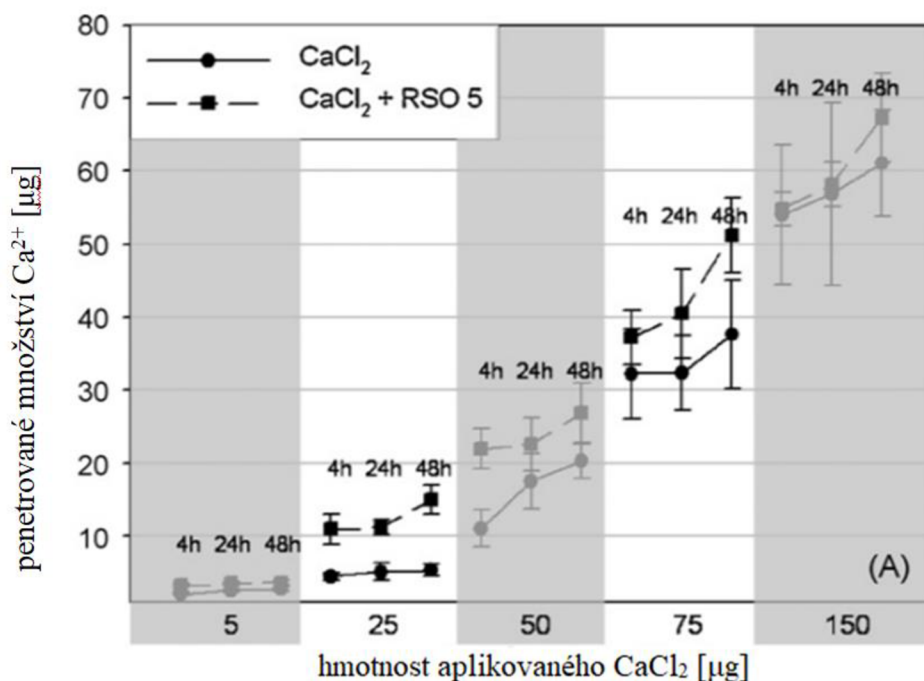
Aplikované roztoky solí prochází kutikulární membránou pomocí polárních pórů. Jedním z faktorů, ovlivňující příjem látek je plocha rozptýlených kapek na povrchu kutikuly. Rozptylování závisí na vlastnostech roztoku, jako je viskozita a povrchové napětí. Dále je závislá také na homogenitě, případně drsnosti povrchu kutikuly. Obvykle se zvyšujícím se rozptylováním roste také rychlost vysychání aplikovaného roztoku a roste koncentrační gradient mezi donorem a vnitřní stranou kutikuly [61].

Pro charakterizaci a kvantifikaci plochy kapky aplikované na povrchu byl použit rastrovací elektronový mikroskop (SEM) s disperzní rentgenovou mikroanalýzou. Malá kapka roztoku o objemu 1 μl byla aplikována na adaxiální stranu kutikuly. Kapka byla sledována pomocí SEM, kterým byla zjištěna rozšiřující se plocha na kutikule a konečná plocha pokrytá vápníkem.

Penetrační experimenty byly prováděny tzv. „infinite-dose system“, neboli způsobem nekonečného dávkování. Tento způsob je využíván za účelem eliminace problémů spojených s penetračními studii zahrnující živé tkáně a schnoucí aplikované kapky a poskytují vysoký stupeň kontroly za definovaných podmínek [61].

Kutikuly rajčete byly umístěny do nerezové misky, plněné demineralizovanou vodou o objemu 1,35 ml. Kutikula byla vždy abaxiální stranou v kontaktu s roztokem, který zde sloužil jako přijímací roztok. Kutikula byla opatrně uchycena kovovým kroužkem tak, aby nedošlo k mechanickému poškození a na ni bylo dávkováno 5 kapek roztoku o objemu 1 μ l o různé koncentraci chloridu vápenatého. V přijímacím roztoku byla pak v časech 4, 24 a 48 hodin měřena koncentrace vápenatých iontů pomocí metody atomové absorpční spektrometrie. Měření probíhalo při konstantních podmínkách (20°C a 70 % vlhkosti) [61].

Množství penetrovaného vápníku bylo měřeno pro roztok CaCl_2 a roztok CaCl_2 se změkčovadlem ethoxylovaný řepkový olej RSO 5 (angl. ethoxylated rapeseed oil). Celkové penetrované množství vápenatých iontů se zvyšovalo s koncentrací aplikovaného roztoku. Z výsledků také vyplynul vliv změkčovadla, který zvětšoval povrch aplikované kapky, a došlo k penetraci většího množství vápenatých iontů. Jedno z měření koncentrace přijatých vápenatých iontů v závislosti na koncentraci roztoku je znázorněno na Obr. 16 [61].



Obr. 16: Závislost penetrovaného množství vápníku na koncentraci aplikovaného roztoku soli [61].

4.4 Kvantifikace pomocí měření elektrického potenciálu

Podle studie mechanismu průchodu iontů přes kutikulární membránu se usuzuje, že hlavní vliv na průchod aktivních látek přes kutikulu mají kutikulární póry. Vědec Schönherr [56] ve své práci uvádí, že na 1 cm^2 kutikuly se nachází kolem 10^{10} pórů. Póry mohou mít v závislosti na struktuře různou polaritu. Difúze skrz polární póry pravděpodobně vysvětluje, proč roste elektrický potenciál, při průchodu solí skrz izolované kutikuly.

V práci Tyree a kol. [62] měří tok iontů pomocí změny koncentrace a elektrického potenciálu roztoku KCl a za konstantního elektrického potenciálového gradientu předpokládají vztah:

$$J_j = -P_j \frac{x}{1 - e^x} (C_j^0 - C_j^i e^x), \quad (12)$$

kde J je tok iontů, P je permeabilita, C je koncentrace, index j značí j -tý iontový druh, indexy i a 0 značí roztoky na dvou stranách membrány. Hodnota x je určena ze vztahu:

$$x = \frac{z_j F E^{i0}}{RT}, \quad (13)$$

kde z je mocnství, F je Faradayova konstanta, R je univerzální plynová konstanta, T je teplota a E^{i0} je rozdíl elektrického potenciálu [62].

Při průchodu KCl přes kutikulu je tok aniontů a kationtů stejný ($J_K = J_{Cl}$). Z platnosti daných vztahů pak platí Goldmanova rovnice:

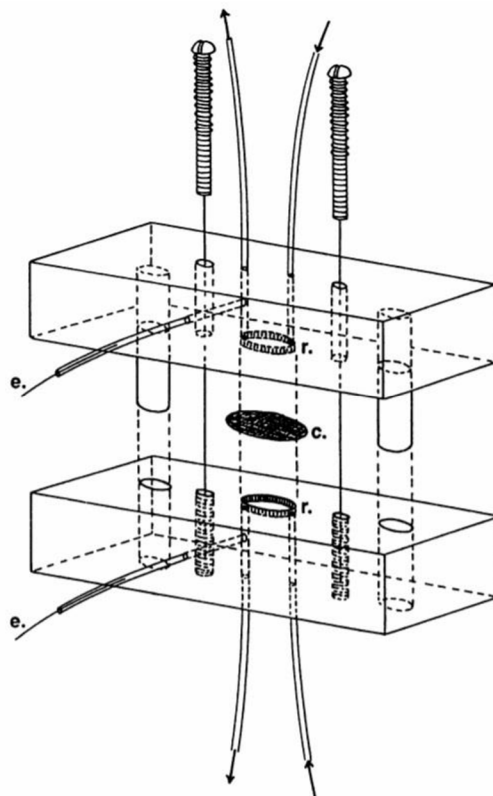
$$E^{i0} = \frac{F}{RT} \ln \frac{P_K [K]^0 + P_{Cl} [Cl]^i}{P_K [K]^i + P_{Cl} [Cl]^0} = \frac{F}{RT} \ln \frac{(1 + P_R C_R)}{C_R + P_R}, \quad (14)$$

kde P_K a P_{Cl} jsou permeability iontů K^+ a Cl^- , $[K]$ a $[Cl]$ značí koncentrace iontů na vnitřní (index i) a vnější (index 0) straně, P_R je poměr permeabilit P_K/P_{Cl} a C_R je poměr koncentrací C^i/C^0 za podmínek $[K]^0 = [Cl]^0$ a $[K]^i = [Cl]^i$ [62].

Permeabilita rovněž závisí na dalších podmínkách, jako je mobilita a tloušťka membrány a je nutné, aby elektrické pole bylo konstantní. Z rovnice (14) vyplývá, že elektrický potenciál vzniká pouze při pasivních difúzních procesech. Tento předpoklad je však zřídka splněn v biologických membránách a odchylky bývají zdůvodněny přítomností iontových pump [62].

K měření byly vybrány kutikuly adaxiální strany listů javoru a pomerančovníku, izolované enzymatickou metodou. K rozlišení adaxiální strany izolovaných kutikul byl použit rastrovací elektronový mikroskop. Difúzní potenciál byl měřen na kutikulách a pro srovnání také na jiných umělých membránách [62].

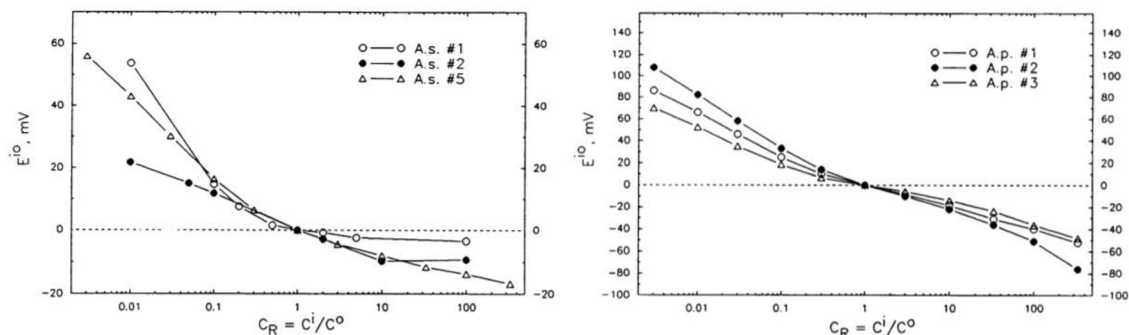
Kutikuly byly vloženy mezi dvě komory průtočné cely. Jako těsnění byl využit silikonový tuk. Různé koncentrace roztoku KCl byly simultánně čerpány přes dvě strany kutikuly, aby se vytvořil iontově koncentrační gradient. Do obou cel byly vloženy elektrody spojené solným můstkem k měření potenciálového rozdílu. Kutikula byla umístěna tak, že vnější povrch směřoval k uzemněné elektrodě, napětí E^{i0} bylo měřeno na vnitřní straně kutikuly. Elektrické měření probíhalo při čerpání roztoku $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Celá aparatura byla umístěna ve Faradayově kleci [62]. Její schéma je znázorněno na Obr. 17.



Obr. 17: Aparatura použitá k upevnění kutikuly (c.), kutikula je vložena mezi dva rezervoáry (r.), šipky znázorňují přítok a odtok roztoku, (e.) znázorňuje umístění elektrod [62].

Měření potenciálů probíhalo při třech různých podmínkách. V prvním případě byla měněna iontová síla i poměr koncentrací, v druhém byla iontová síla konstantní a byl měněn poměr koncentrací, v třetím bylo měřeno při různé iontové síle a konstantním koncentračním poměru [62].

Z výsledků měření vyplývá, že byl naměřen podstatně velký elektrický potenciál na kutikulách vystavených různým koncentračním poměrům (C_R). Potenciál roste nebo klesá v závislosti na měnící velikosti C_R , což je zobrazeno na Obr. 18. Pokusy také dokázaly, že potenciál roste s klesající iontovou silou roztoku [62].

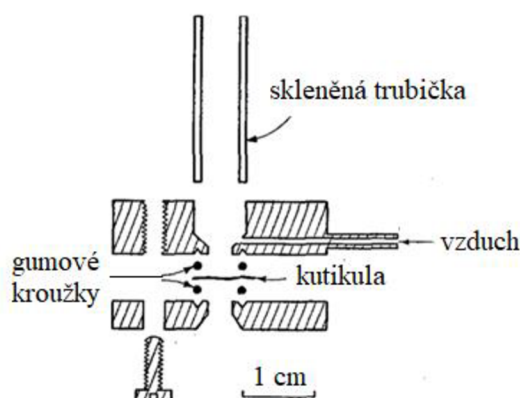


Obr. 18: Difúzní potenciál (E^D) izolovaných kutikul javoru (A.s.) a platanu (A.p.) vystavených koncentračnímu gradientu roztoku KCl [62].

V závěru je poukázáno na možnost použití klasické Donnanovy rovnováhy pro případ výpočtu rovnovážné koncentrace iontů mezi materiálem a roztokem, pokud předpokládáme rovnoměrnou distribuci náboje v roztoku, a také je možné vypočítat koeficienty rozdělení a propustnost membrán. V případě kutikul má velký vliv tloušťka a struktura kutikuly a interakce difundovaných iontů s póry v kutikulách [62].

4.5 Určování permeability z Fickova zákona

V práci [63] z roku 1957 autor Treherne uvádí možné měření difúze neelektrolytů skrze izolované kutikuly hmyzu, konkrétně sarančete. Kutikula byla upevněna v aparatuře znázorněné na Obr. 19. Jako difúzní médium byl používán etanol, močovina a thiomčovina.



Obr. 19: Aparatura pro měření difúze přes kutikuly hmyzu [63].

Kutikula byla vložena mezi dva gumové kroužky, které jsou upevněny v rýhách mosazné konstrukce, která byla utažená šroubem. Kutikula tvořila dno cely a byla v kontaktu s oksyločeným solným roztokem, do něhož byla ponořena a celá aparatura. Plocha kutikuly odpovídala $0,283 \text{ cm}^2$ a objem roztoku v cele byl 1 ml. Měření probíhalo při teplotě $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Do difúzních experimentů byl zahrnut také vliv kutikulárních vosků, které byly z kutikul odstraněny máčením v chloroformu. Výsledky difúze přes chloroformem ošetřené kutikuly byl srovnán s výsledky pro neupravené kutikuly.

Výstupem byla vzrůstající koncentrace etanolu ve spodní části aparatury. Permeabilita P , v jednotkách $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, byla počítána podle Fickova zákona:

$$P = \frac{V}{At} \ln \frac{C_0 - C_i}{C_0}, \quad (15)$$

kde C_i a C_0 jsou koncentrace testovací látky nad a pod kutikulou v čase t po začátku měření. A je plocha kutikuly, která je vystavena objemu solu V v difúzní cele [63].

Z výsledků vyplynul výrazný vliv kutikulárních vosků na rychlost difúze všech použitých difúzních médií. Permeabilita etanolu byla o dva řády vyšší při měření přes kutikulu ošetřenou chloroformem. Odolnost kutikuly vůči difúzi pak činila 49,5 %. Větší vliv měla extrakce vosků z kutikuly na permeabilitu močoviny, jejíž odolnost vůči difúzi byla pouze 1,1 % [63]. Autor také vyvodil, že permeabilita kutikuly se neměnila v závislosti na čase a koncentraci média a že je vhodným parametrem difúze přes kutikuly.

4.6 Stanovení difúzního koeficientu KCl

Tyree [64] se zabýval stanovením difúzního koeficientu D roztoku KCl přes izolované adaxiální kutikuly pomerančovníku hořkého (*Citrus aurantium*) a to pomocí difúzních cel při podmínkách „steady-state“ neboli ustáleném stavu. K svým experimentům využili analytické metody měření elektrické vodivosti. Získané D pak byly porovnávány s difúzním koeficientem KCl ve vodě ($2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$).

K izolaci kutikul použili enzymatickou metodu izolace, která byla využita také v publikacích [15], [44] a také v této diplomové práci. Kutikuly byly vkládány do roztoku KCl komory průtočné cely o průměru 6,4 mm a roztok KCl byl do cely čerpán pomocí peristaltické pumpy rychlostí 0,2 ml/min. Vodivost byla měřena v difúzní cele v závislosti na změně koncentrace KCl (1000 až 3 mol/m³). Měření probíhalo do ustálení koncentrace na obou stranách kutikuly, k čemuž došlo v časovém rozmezí 6 až 18 hodin.

K analýze kinetické změny vodivosti se změnou koncentrace KCl pak byl využit druhý Fickův zákon, z kterého získali informace o difúzním koeficientu iontů:

$$\lambda = D \cdot a \cdot |z|^2 \cdot F^2 \cdot C^0 / RT, \quad (16)$$

kde λ je elektrická vodivost, D je difúzní koeficient, a značí průměr kutikuly, z je náboj iontů, F je Faradayova konstanta, C^0 značí koncentraci roztoku, R je univerzální plynová konstanta a T je teplota.

Velikost difúzního koeficientu pro KCl byla stanovena $1 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$ přes kutikuly pomerančovníku, jejichž vosková vrstva, pokrývající kutikulu o tloušťce přibližně 1 μm , byla měřena rastrovacím elektronovým mikroskopem a měla tloušťku 0,6 μm . Určená hodnota D byla o 6 řádů menší než hodnota D KCl ve vodě. Při měření difúzního koeficientu čisté vody přes izolované kutikuly pomerančovníku určili hodnotu $5 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$, což bylo téměř stejně jako D pro KCl. Bylo odvozeno, že adaxiální kutikuly pomerančovníku jsou silně hydrofobní kutikuly s nízkou propustností, jelikož jsou z 60 % tvořeny vosky [64].

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

a) *Isobutylmethakrylátová pryskyřice*

chemikálie	výrobce
ViaFix Liquid	Struers
ViaFix Powder	Struers

b) *Chemická metoda izolace rostlinných kutikul*

chemikálie	čistota	výrobce
chlorid zinečnatý	97 %	Lach-ner, s.r.o.
kyselina chlorovodíková	p.a.	Sigma-Aldrich

c) *Enzymatická metoda izolace rostlinných kutikul*

chemikálie	čistota	výrobce
kyselina citrónová	99,5 %	Sigma-Aldrich
citrát sodný	99,5 %	Sigma-Aldrich
pektináza	p.a.	Sigma-Aldrich
celulóza	p.a.	Sigma-Aldrich
azid sodný	p.a.	Sigma-Aldrich

d) *Difúzní médium*

lignohumát draselný		Amagro s.r.o.
chlorid draselný	p.a.	Lach-ner, s.r.o.

5.2 Použité přístroje a další zařízení

Přístroj	Specifikace
Optický mikroskop	Olympus IX 71 s přidavným světelným zdrojem (Olympus TH 4 – 200) s digitálním fotoaparátem (Olympus Camedia C – 4040Zoom)
Rastrovací elektronový mikroskop	Carl Zeiss, EVO LS 10
Profilometr	Bruker Dektak XT
pH metr	Mettler Toledo
Konduktometr	Mettler Toledo
Tenziometr	KSV Sigma 701

Termogravimetrický analyzátor	TGA Q5000 TA Instruments
SEC-UV-dRI	Wyatt + Agilent
Vláknový spektrofotometr	OceanOptics USB200+ s UV-VIS optickými sondami
UV-VIS spektrometr	Hitachi U3900
Magnetická míchačka vícemístná	IKA RO 15, IKA – WERKE GMBH & CO. KG
Horizontální difúzní cely	PermeGear
Nitrocelulózová membrána	PRAGOPOR, PRAGOCHEMA spol. s.r.o., velikost pórů 0,4 μm

5.3 Separace rostlinných kutikul

Pro účely studia difúze byly vybrány dva typy kutikul. Prvním typem byly kutikuly listů *Prunus laurocerasus* (česky bobkovišň lékařská), které byly pro studium difúze přes rostlinné kutikuly [15] a studium sorpce látek na kutikuly využity ve vědeckých pracích a [44]. Její listy jsou tvrdé a silné, od čehož se odvíjí i vlastnosti kutikul, které jsou tak využitelné pro studium difúze.

Pro izolaci kutikul bobkovišně lze využít jak chemickou, tak enzymatickou metodou. Výsledkem jsou pevné, transparentní kutikuly, se kterými se dá snadno manipulovat. Horní a spodní kutikuly bobkovišně mají rozdílnou strukturu. Tato vlastnost je pro každou rostlinu specifická. Mohou se vyskytovat druhy, které mají stomata na obou stranách kutikul nebo stomata zcela postrádají. Cílem práce bylo mimo jiné porovnat rozdílné struktury izolovaných kutikul, což je faktor, který může ovlivnit transportní procesy lignohumátu draselného přes listy rostlin. V případě bobkovišně se stomata vyskytují v řádech sta tisíců na cm^2 . Více o jejich vlastnostech a struktuře zmiňuje ve své publikaci Jetter [38], jehož poznatky jsou shrnuty v kap. 3.2.2.

Stejně jako ve studiích uvedených v kap. 4, i zde byly kutikuly izolovány dvěma metodami, chemickou a enzymatickou. Metody izolace byly také využívány v publikacích [15], [44] a [65]. Druhým typem kutikul pro studium difúze byly kutikuly plodů rajčete jedlého, které byly izolovány mechanicky a také oběma výše zmíněnými metodami. Postup a využití chemikálie pro separaci kutikul má vliv na jejich vlastnosti, proto byly očekávány rozdíly v průběhu difúzí přes takto izolované membrány.

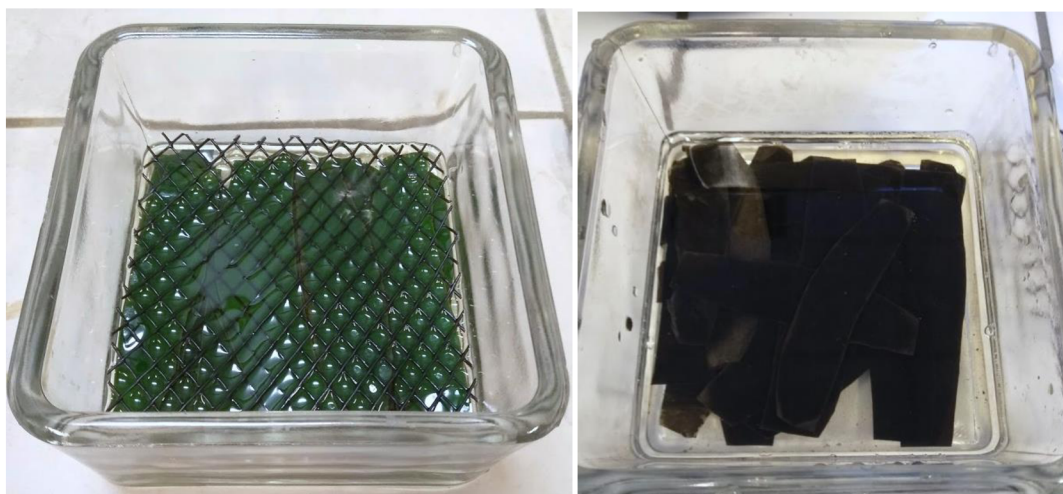


Obr. 20: Bobkovišeň lékařská (*Prunus laurocerasus*) [15].

Detail listů bobkovišně je zachycen na Obr. 20. Pro obě metody izolace byly vybírány zdravé listy bez mechanického poškození a po jejich důkladném omytí v destilované vodě byly pomocí skalpelu zbaveny řapíku a okrajů listu. Následně byly takto upravené listy ukládány do prázdných skleněných nádob adaxiální (horní) stranou nahoru a byly zatíženy sítčkou. Rajčata byla nakrájena na měsíčky, opatrně byla zbavena dužniny a byla vložena do nádoby stejně jako listy bobkovišně. Na závěr byla rajčata rovněž připevněna plastovou mřížkou, aby bylo zamezeno jejich pohybu, poškození a vyplavení na povrch izolačního roztoku.

5.3.1 Chemická metoda izolace kutikul

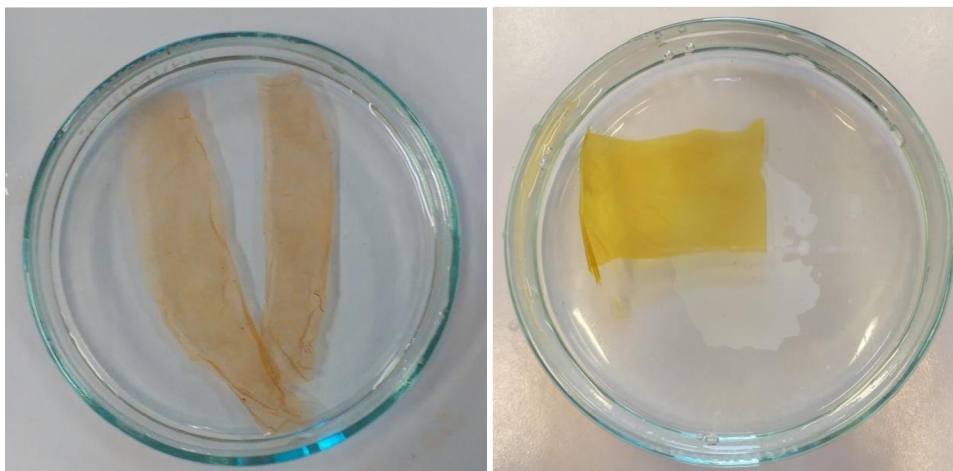
Separční roztok byl připraven z 60 hm. % roztok $ZnCl_2$ v koncentrované HCl. Takto připravený roztok byl převeden na připravené listy v nádobě. Nakonec byla nádoba s ponořenými listy utěsněna parafinem, aby se zamezilo odpařování roztoku a potenciální změně izolačního roztoku z důvodu jeho zakonzentrovávání. Připravené listy s izolační směsí jsou uvedeny na Obr. 21 vlevo.



Obr. 21: Listy připravené k chemické izolaci (vlevo). Listy s odumřelými pletivými po chemické izolaci (vpravo).

Chemická metoda izolace (CHMI) je časově méně náročná ve srovnání s metodou enzymatickou. Listová pletiva jsou izolačním roztokem rozložena v rámci tří až pěti dnů. Při izolaci dojde k rozkladu mezofylu listu a ke změně barevnosti, což je vidět na Obr. 21

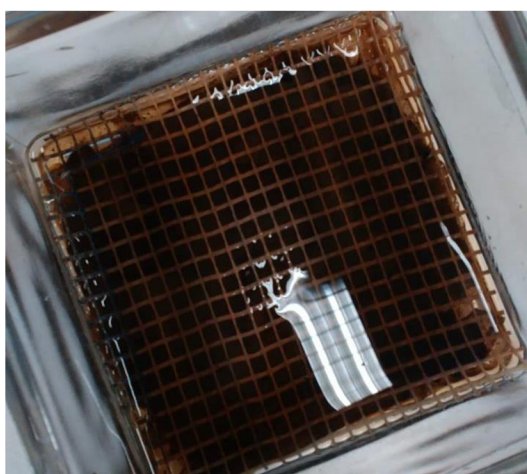
vpravo. Kutikuly pak byly vloženy do Petriho misek s destilovanou vodou a zbytky rozložených listových pletiv byly z kutikul jednoduše mechanicky odstraněny měkkým štětcem. Bylo nutné dbát opatrnosti, aby nedošlo k poškození kutikul. Očištěné kutikuly jsou zobrazeny na Obr. 22.



Obr. 22: Očištěné kutikuly izolované chemickou metodou pro bobkovišeň lékařskou (vlevo) a pro rajče jedlé (vpravo).

5.3.2 Enzymatická metoda izolace kutikul

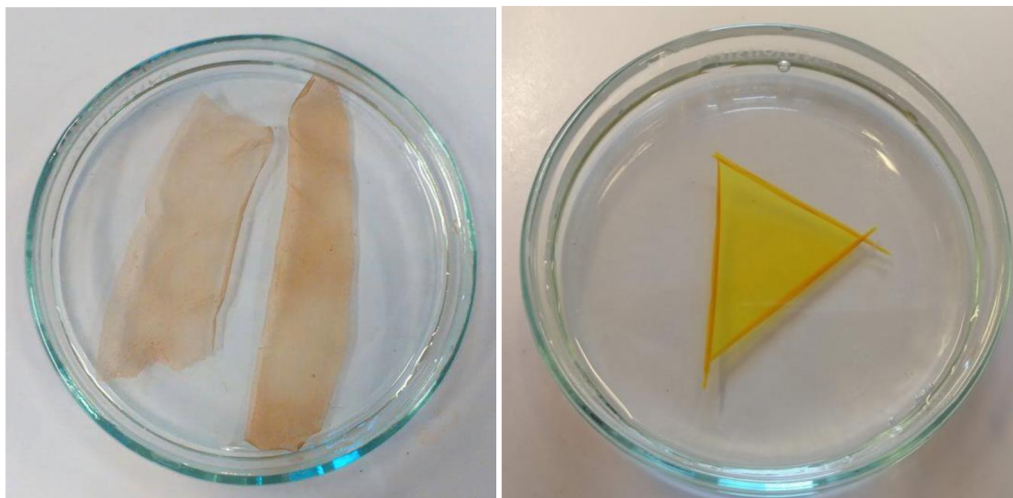
Pro enzymatickou metodu izolace (EMI) byly listy omyty v destilované vodě a byly zbaveny řapíku stejně jako v případě chemického způsobu izolace. Izolační směs se skládala z 5 hm. % enzymu pektinázy a 5 hm. % celulózy. Roztoky těchto enzymů byly připraveny rozpouštěním požadované navážky pektinázy a celulózy v $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ citrátovém pufru, jehož pH se pohybovalo v rozmezí 3–4 (kontrolováno pH metrem před samotným použitím citrátového pufru). Objem izolačního roztoku v této fázi činil 45 ml. Pro zabránění mikrobiální kontaminace listů, bylo do směsi přidáno 5 ml 5 obj. % azidu sodného. Připravená směs byla převedena na listy. V posledním kroku byla nádoba utěsněna parafinem, aby nedocházelo k již výše zmíněnému zakoncentrovávání izolačního roztoku.



Obr. 23: Enzymatická izolace kutikul před separací.

EMI rostlinných kutikul byla časově náročnější než CHMI, trvala přibližně 6 týdnů. Během izolace opět proběhl rozklad listových pletiv, což se projevilo hnědým zbarvením listů

a izolačního roztoku, jak je možné vidět na Obr. 23. Po ukončení doby izolace byly kutikuly omyty v destilované vodě a očištěny štětcem. Na Obr. 24 vlevo jsou vyfoceny enzymaticky izolované kutikuly bobkovišně a na Obr. 24 vpravo kutikula rajčete.



Obr. 24: Enzymaticky izolované kutikuly bobkovišně (vlevo) a rajčete (vpravo).

5.4 Charakterizace izolovaných kutikul

List je pokryt kutikulou z horní i spodní strany, jak již bylo uvedeno v práci [44], kde byly popsány i jejich odlišnosti. Prvním pozorovatelným rozdílem jsou stomata, která jsou přítomná na spodní kutikule. Další odlišnosti jsou zapříčiněny samotnou metodou izolace kutikul. Průběh difúze přes rostlinné kutikuly je závislý na jejich vlastnostech, jako jsou chemická struktura, přítomnost stomat a tloušťka kutikuly. Proto je důležité kutikuly podrobit důkladné analýze.

5.4.1 Optická mikroskopie

K rozřazení kutikul na adaxiální a abaxiální byla využita optická mikroskopie, kdy hlavním poznávacím znakem byla stomata (pro abaxiální kutikuly). První analýza byla provedena pomocí optického mikroskopu Olympus IX 71 s přídatným světelným zdrojem (Olympus TH 4–200) a digitálním fotoaparátem (Olympus Camedia C – 4040Zoom). Jednotlivé kutikuly byly naneseny na mikroskopická sklíčka a snímky byly vytvořeny při 60 násobném zvětšení pomocí softwaru CellSens Entry.

5.4.2 Rastrovací elektronová mikroskopie

Detailní struktura kutikul, zejména jejich povrch, byla sledována pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) od firmy Carl Zeiss (EVO LS 10). Kutikuly byly pro měření sušeny na mikroskopických sklíčkách a byly rozděleny na adaxiální (horní) a abaxiální kutikuly (spodní). Dále byly rozděleny na vnější (povrch vystavený okolnímu prostředí) a vnitřní (povrch navazující na listová pletiva uvnitř listu) stranu. Samotný rastrovací elektronový mikroskop byl nastaven na napětí 15 kV, elektrický proud 307 pA, pracovní vzdálenost 12 mm, tlak $1,0 \cdot 10^{-3}$ Pa a každý vzorek byl vyfocen při 200, 500, 1 500 a 5 000 násobném zvětšení.

5.4.3 Profilometrie

Tloušťka a drsnost izolovaných kutikul byla měřena pomocí profilometru Bruker Dektak XT. Kutikuly byly pro měření připraveny na mikroskopická sklíčka. Po jejich přenesení na sklíčka byly pomocí štětce upraveny do rovny plochy, aby snadněji přilnuly k podkladu a vytvořily homogenní povrch a kutikuly výborně přilnuly na plochu sklíčka. Profil měření byl nastaven do režimu „HillsAndValleys“ (česky vrcholky a prohlubně), doba skenu odpovídala 30 s a po tuto dobu byla měřena skenovací plocha 5 mm.

5.5 Charakterizace roztoku Lignohumátu A

Pro studium transportu aktivních látek přes výše izolované rostlinné kutikuly byl zvolen vzorek komerčního kapalného hnojiva s označením Lignohumát A (lignohumát draselný, komerční dodavatel Amargo s.r.o). Vzhledem k tomu, že se jedná o průmyslově vyráběný produkt, jehož fyzikálně-chemické vlastnosti nejsou dostatečně kvantifikovány, bylo nutné toto zvolené difúzní médium podrobit základní charakterizaci. Pro charakterizaci byly vybrány metody relevantní pro studium transportních procesů uvedených níže.

5.5.1 Tenziometrické měření roztoku LH

Vzhledem k tomu, že huminové látky mají schopnost snižovat povrchové napětí vodných roztoků, jak bylo zmíněno v kap. 3.1.2, jako první metoda pro charakterizaci lignohumátu draselného byla zvolena tenziometrie. Tato metoda slouží k měření povrchového napětí roztoků, a protože potenciální snížení povrchového napětí může usnadnit průchod LH přes hydrofobní kutikulu, bylo nezbytné provést toto měření.

Připravené roztoky LH o objemu 20 ml a koncentracích 1 hm. %, 5 hm. % a 10 hm. % byly proměřeny na tenziometru KSV Sigma 701. Měření bylo provedeno pomocí programu Sgserver, jehož nastavení parametrů bylo následující: doba měření vzorku 10 minut, měřicí sondou byl „standart ring“ (standardní kroužek), nádoba „small“ (malá), „Heavy phase“ (těžká fáze) byla nastavena voda a „Light phase“ neboli lehká fáze byl zvolen vzduch.

5.5.2 Měření vodivosti a pH roztoku LH

Jelikož hodnota pH, coby základního fyzikálně-chemického parametru vodných roztoků, má výrazný vliv na strukturní vlastnosti supramolekulárních či polymerních látek, lignohumátu nevyjímaje, bylo nezbytností stanovit pH používaných difúzních roztoků. Změnou pH může docházet ke změně konformace, s čímž souvisí také změna velikosti částic a potenciální interakce difundující látky s kutikulou, což zásadním způsobem ovlivňuje finální transportní vlastnosti. K měření vodivosti byl využit konduktometr Mettler Toledo. Pro toto měření byly připraveny roztoky LH o koncentracích 5 hm. % a 10 hm. %.

5.5.3 Termogravimetrická analýza roztoku LH

Termogravimetrie se řadí mezi termické analytické metody. Měřený vzorek je vystaven tepelnému namáhání a na citlivých mikrováhách je sledována změna jeho hmotnosti v závislosti na čase či na teplotě. Nejčastěji sledovaným procesem je změna hmotnosti vzorku při jeho degradaci zahříváním. Pomocí TGA mohou být kromě úbytku hmotnosti vzorku působením teploty zjištěny také oxidační vlastnosti látky či její složení.

Termogravimetrická analýza (TGA) byla využita pro komerční vzorek Lignohumát A. Cílem použité metody byla základní charakterizace vzorku, ve kterém byla zjišťována vázaná vlhkost a množství čisté AI, která se v komerčním práškovém vzorku nachází.

Vzorek Lignohumátu A byl analyzován na termogravimetrickém analyzátoru TGA Q5000. Experimenty probíhaly v teplotním rozsahu 0 °C až 800 °C po kroku 10 °C. V první řadě byly vzorky zahřívány v proudu kyslíku a v druhém měření v proudu inertního plynu, konkrétně dusíku.

5.5.4 Analýza LH pomocí SEC-UV-dRI

K charakterizaci polymerů je často využívána technika velikostně vylučovací chromatografie s detektorem rozptylu světla (SEC-MALS). V případě této diplomové práce byl použit detektor UV a diferenční refraktometr (dRI). Cílem použití této analytické metody bylo zjistit molekulární hmotnost používaného Lignohumátu A.

K analýze byl připraven vzorek LH o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, který byl před měřením filtrován přes membránu o velikosti pórů $0,45 \text{ } \mu\text{m}$. Použitá kolona byla kalibrována na roztoky polystyren sulfonátu o molekulových hmotnostech 1,53 kDa, 5,18 kDa, 16 kDa, 34,7 kDa, 57,5 kDa a 100 kDa. Mobilní fáze byl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátový pufr o pH 7. Průtok mobilní fáze byl nastaven na $0,6 \text{ ml/min}$ a velikost nástřiku byla $50 \text{ } \mu\text{l}$.

5.6 Difúzní experimenty

Na základě předchozích experimentů M. Laštůvkové [15], [65] bylo dokázáno, že roztok lignohumátu draselného je schopný difundovat přes rostlinné kutikuly. Experimenty byly prováděny odlišnou metodikou v pomocných hydrogelových systémech, mezi nimiž byla umístěna kutikula (více informací uvedeno v publikaci).

Vzhledem k tomu, že na pracovišti, kde tato diplomová práce vznikla, nebyla prozatím testována možnost využití Stokesových difúzních cel pro transkutikulární studium aktivních látek, hlavním cílem této práce bylo navrhnout a optimalizovat unikátní metodiku využívající Stokesových horizontálních difúzních cel. Ty jsou tvořeny zdrojovou komorou s roztokem o dané koncentraci a přijímací komorou s čistým prostředím, zpravidla vodou či roztokem o nižší koncentraci. Objem zdrojové a přijímací komory je 50 ml.

Navržená, optimalizovaná technika může sloužit jako univerzální metoda pro stanovení jiných i nebarevných vzorků zejména iontů např. dusíková, fosforečná, draselná nebo organické látky detekovatelné v charakteristické části UV-VIS oblasti.



Obr. 25: Stokesovy difúzní cely.

5.6.1 Sestavení aparatury a využitá instrumentace pro měření difúze LH

Správný matematický popis transportních experimentů vyžaduje neměnnou plochu bariéry, přes kterou probíhá difúze zvoleného média. V případě této diplomové práce byly bariérou rostlinné kutikuly, u kterých je obtížné zajistit neměnnou difúzní plochu, jelikož každá získaná kutikula má jiné rozměry. Z tohoto důvodu byla využita možnost zalití kutikuly do pryskyřice o definovaném vnějším a vnitřním rozměru formy, čímž byla vytvořena stejná plocha pro všechny využitě vzorky, přes kterou mohla difúze probíhat. Zároveň se předešlo pronikání difúzního média mimo definovanou plochu bariéry.

Kutikuly jsou tenké vrstvy o tloušťce v řádech mikrometrů. Stokesovy difúzní cely jsou zkonstruované pro difúze přes membrány o průměru 2 cm. Při umístění kutikuly mezi komory takového rozměru pak hrozí její protržení a zkreslení naměřených výsledků. Proto bylo zapotřebí kutikuly připravit plochu kutikuly menší velikosti, přes kterou bude transport probíhat (průměr kutikuly odpovídal 1,5 cm) a zároveň, upevnit ji tak, aby nedošlo

k obtékání kutikuly roztokem LH, což by opět vedlo k nevěrohodnosti výsledků. Proto byly kutikuly zalaty do pryskyřice (Obr. 26), čímž se zmenšilo riziko jejího mechanického poškození a hlavně zkreslení výsledků penetrace.



Obr. 26: Příprava kutikuly pro difúze.

Příprava membrány pro difúzi probíhala následovně. Kutikuly byly po izolaci usušeny na umělohmotné síťce, která usnadňovala její další manipulaci. Pro difúzní experimenty byly zvoleny dva typy vrstev, první typ byl tvořen z 1 kutikuly a druhý byl tvořen z 5 kutikul. Jednovrstevný systém byl využit pro replikaci experimentů M. Laštůvkové [65] avšak v modelu difúzních cel. Naměřené výsledky byly následně porovnány.

Pilotní experimenty byly také prováděny přes celé listy bobkovišně, které byly zalaty do pryskyřice. Při měření však nebyl v čase tří týdnů zaznamenán žádný signál, jelikož tloušťka mezofylu listu neumožnila průchod LH skrz celý list. Proto byl vytvořen model pětivrstevného systému, který měl sloužit k co nejlepší simulaci rostlinného listu. Tento model byl zvolen na doporučení Ing. Jaroslava Záhory, CSc. z Mendelovi Univerzity, z Ústavu agrochemie, půdoznalectví, mikrobiologie a výživy rostlin.



Obr. 27: Sušící proces vrstvených kutikul (vlevo) a usušená kutikula (vpravo).

Po usušení byly rostlinné kutikuly skalpelem nařezány na čtverce velikosti 2×2 cm. Takto připravená vrstva byla vložena do středu teflonové formy (Obr. 28 vlevo). Celý systém byl dobře utažen kovovými šrouby, aby nedošlo k proniknutí pryskyřice do středu membrány. Po obvodu byla forma přelepena lepicí páskou, aby nedošlo k úniku pryskyřice vlivem netěsností.



Obr. 28: Usušená vrstva kutikuly ve středu teflonové formy (vlevo), složená forma (vpravo).

Methakrylátová pryskyřice firmy ViaFix byla připravena podle návodu smícháním práškového poly(ethyl)methakrylátu a kapalného 60 hm. % isobutyl-methakrylátu v poměru 11:9. Připravená směs byla ihned nalita otvorem do připravené formy s kutikulou. Se směsí bylo zacházeno nejlépe tak, aby se v ní tvořilo minimum vzduchových bublinek. Po 24 hodinách byla hmota s kutikulou vyjmuta z formy a dále byla využita pro transportní experimenty.

Difúzní experimenty byly realizovány pro kutikuly bobkovišně lékařské izolované chemickou a enzymatickou metodou, dále byly využity kutikuly rajčete jedlého, které byly mechanicky izolované (MI), chemicky izolované (CHI) a enzymaticky izolované (EI).

Jak již bylo zmíněno výše, ke studiu transportních procesů LH přes kutikuly byly využity Stokesovy difúzní cely. Před zahájením měření byla sestavena aparatura (Obr. 29). Mezi zdrojovou a přijímací komorou byla umístěna kutikula zalitá v pryskyřici a celý spoj byl upevněn svorkou. Do obou komor bylo vloženo magnetické míchadlo.



Obr. 29: Aparatura pro měření difúze LH přes kutikulu.

Následně bylo připraveno 50 ml roztoku LH a 50 ml vody. Pro difúzi přes kutikuly bobkovišně byl pipetován 5 hm. % roztok LH, pro difúzi přes kutikuly rajčat byl odměřen 10 hm. % roztok LH. Ihned po přípravě difúzní aparatury byla do přijímací komory s vodou zavedena optická sonda pro měření absorbance a bylo spuštěno měření s automatickým ukládáním dat ve zvolených časových intervalech (30 minut). Měření probíhalo v rozsahu

vlnových délek 300–900 nm. Aby nedocházelo k odpařování rozpouštědla, otvor přijímací komory s optickou sondou byl obalen parafilmem a zdrojová komora byla uzavřena zátkou. Roztoky obou komor byly v celém průběhu měření homogenizovány míchadly při nastavení 200 otáček/min.

Vláknový spektrofotometr OceanOptics USB2000+ s UV-VIS byl před použitím zahříván po dobu 45 minut. Měření probíhalo pomocí softwaru SpectraSuite.

Naměřená spektra byla vyhlazena v programu Origin pomocí funkce „Smooth all curves“ a z dat byly vybírány hodnoty absorbancí pro vlnové délky 500 nm, 600 nm a 700 nm. Z těchto hodnot pak byly pomocí směrnic kalibračních přímek pro zmíněné vlnové délky určeny průměrné koncentrace LH v přijímací cele v závislosti na čase.

5.6.2 Měření difúze KCl přes rostlinné kutikuly

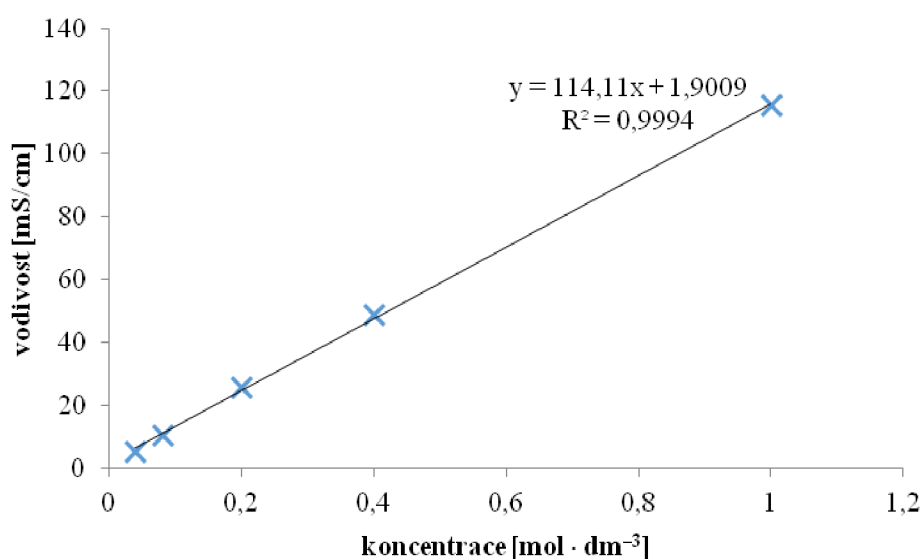
Pro kontrolu penetrace látek skrz kutikulu bylo provedeno měření pomocí referenčního roztoku chloridu sodného (KCl). Mezi horizontální difúzní cely byla umístěna rostlinná kutikula zalitá do pryskyřice. Do zdrojové cely bylo pipetováno 50 ml $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl a do přijímací cely 50 ml vody. Do komory s čistou vodou byla vložena vodivostní sonda napojená na multimetr s automatickým snímáním záznamu a pomocí programu SevenMulti byl nastaven automatický zápis naměřených hodnot elektrických vodivostí v intervalu 10 s. Po celou dobu experimentu byly roztoky v obou komorách homogenizovány míchadly (200 otáček/min).

5.7 Vyhodnocení difúzních experimentů

5.7.1 Určení konstanty difúzní cely β

Stanovení difúzního koeficientu metodou difúzní cely je z hlediska matematiky poměrně náročné. Pro stanovení difúzních experimentů bylo potřeba provést kalibraci difúzní cely. Stokes [66] provádí kalibrace výpočtem konstanty β , která charakterizuje celý systém, v němž difúze probíhá. K realizaci experimentů byly využity horizontální difúzní cely (Obr. 25) a jako měřicí metoda byla zvolena konduktometrie roztoku KCl.

Před samotným měřením byla stanovena kalibrační přímka elektrické vodivosti KCl v rozmezí koncentrací $0,04\text{--}1\text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, která je uvedena na Obr. 30. Naměřené hodnoty byly proloženy přímkou lineární regrese a její rovnice byla vypočtena pomocí funkce LINREGRESE v programu MS Excel.



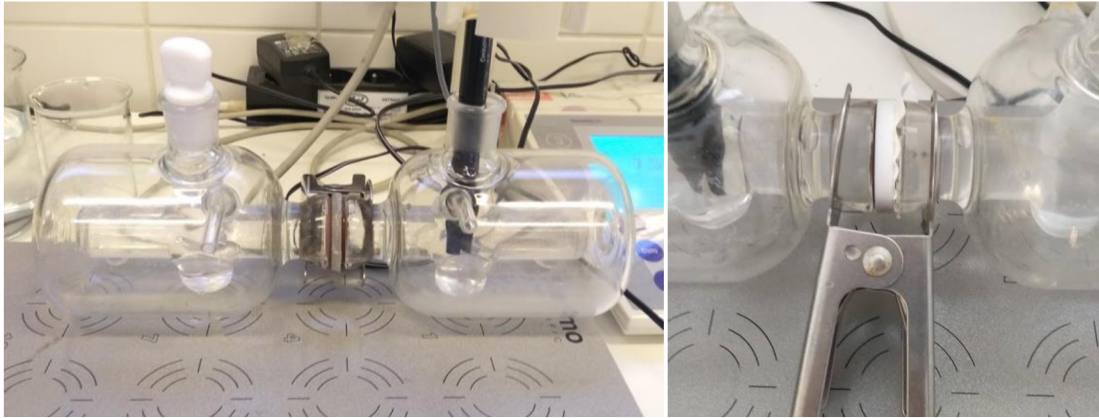
Obr. 30: Kalibrační přímka pro stanovení KCl.

Určení konstanty difúzní cely β vychází ze vztahu:

$$Dt = -\frac{1}{\beta} \ln \left(\frac{(c_z - c_p)_t}{(c_z - c_p)_0} \right), \quad (17)$$

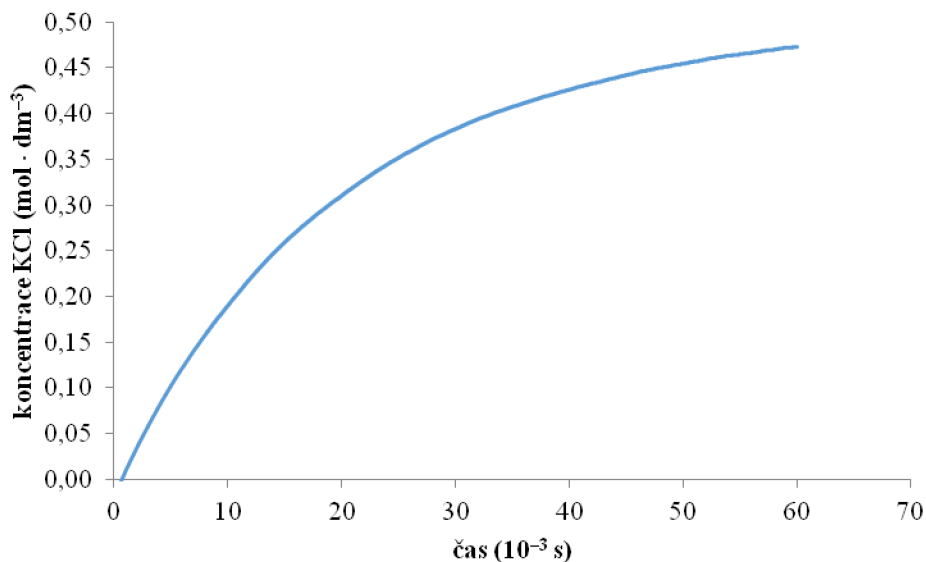
kde D je difúzní koeficient, t značí čas průchodu AI (zde KCl) kutikulou, c_z je koncentrace KCl ve zdrojové komoře difúzní cely a c_p je koncentrace KCl v přijímací komoře difúzní cely. Přírozený logaritmus v pravé části rovnice se pak počítá ze zlomku rozdílů c_z a c_p v čase t a v čase 0.

Pro samotné měření byla sestavena difúzní cela spojením dvou komor, mezi které byla pomocí plastového kroužku a těsnění vložena nitrocelulózová membrána. Pro stanovení konstanty difúzní cely β byla využita syntetická membrána z toho důvodu, že je potřeba využít materiál, jehož difuzivita je známa. Pro daný experiment byla využita membrána PRAGOPOR od firmy PRAGOCHEMA spol. s.r.o. o velikosti pórů $0,4\ \mu\text{m}$. Celá aparatura je znázorněna na Obr. 31 a spoj komor upevněný svorkou je vidět na Obr. 31 vpravo.



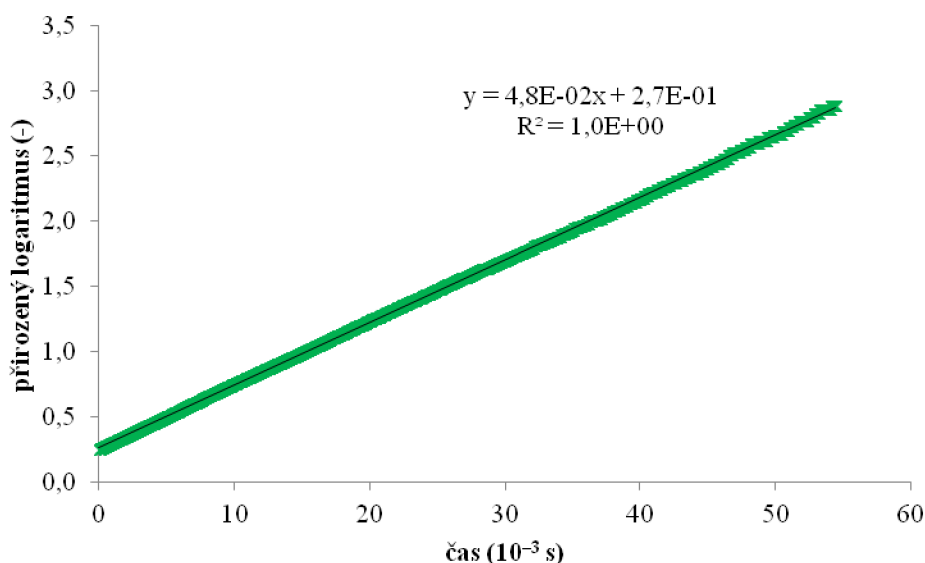
Obr. 31: Stokesova difúzní cela (vlevo), detail vložené nitrocelulókové membrány (vpravo).

Následně byl připraven roztok KCl o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Do zdrojové komory difúzní cely bylo pipetováno 50 ml KCl a do přijímací komory 50 ml čisté vody. K měření difúze KCl byl využit konduktometr Mettler Toledo, jehož sonda byla vložena do přijímací komory s vodou, a v programu SevenMulti bylo nastaveno automatické ukládání dat v časovém intervalu 10 s. Měření probíhalo po dobu 1 dne.



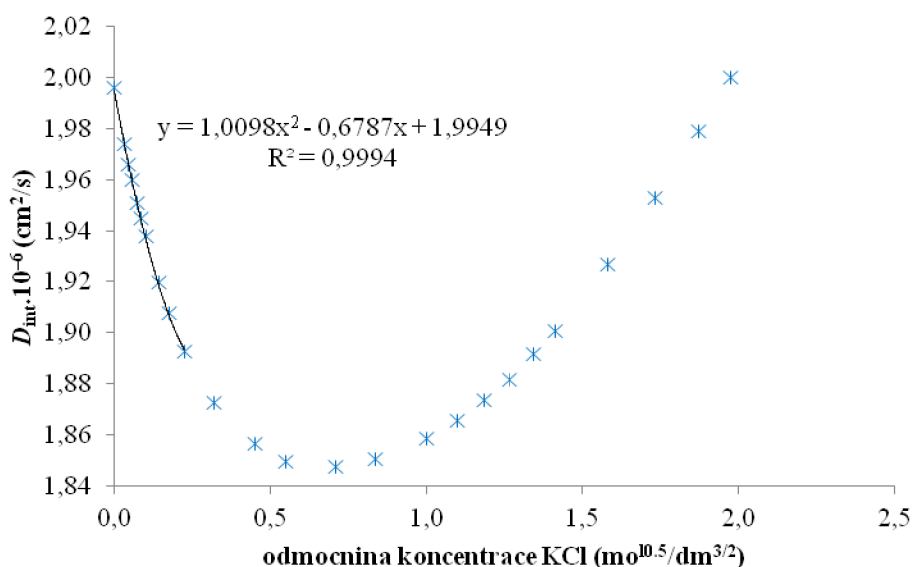
Obr. 32: Závislost koncentrace KCl v přijímací komoře difúzní cely na čase.

Měřená vodivost $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl byla pomocí kalibrační závislosti převedena na koncentrační závislost, jak je vidět na Obr. 32. Z hodnot koncentrací byl vypočten přirozený logaritmus podílu koncentrací c_z a c_p v čase t a v čase 0, jak je uvedeno na pravé straně rovnice (17). Hodnoty přirozeného logaritmu byly vyneseny do závislosti na čase a lineární závislost byla proložena přímkou. Z těchto dat byly opět vypočteny koeficienty rovnice přímkou pomocí funkce LINREGRESE.



Obr. 33: Závislost přirozeného logaritmu počítaného z koncentrace KCl v přijímací komoře na čase.

Dále byla pro výpočet konstanty difúzní cely použita kvadratická funkce, která je znázorněná na Obr. 34 a vychází z reference [57]. Z této kvadratické funkce byly získány koeficienty p , q a r . Hodnota x v rovnici vystupuje jako odmocnina koncentrace KCl v rovnováze, která byla podle grafu na Obr. 32 stanovena na $c = 0,472 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



Obr. 34: Kvadratická závislost dat pro výpočet konstanty difúzní cely β .

Difúzní koeficient byl pak určen dosazením zjištěné koncentrace KCl v rovnováze do kvadratické funkce na Obr. 37, kde $y = D_{\text{int}}$. Dosazením proměnných do kvadratické funkce byla získána rovnice:

$$D_{\text{int}} = \left(p \cdot (\sqrt{c})^2 + q \cdot \sqrt{c} + r \right) \cdot 10^{-9}, \quad (18)$$

Získaný difúzní koeficient $D_{\text{int}} = 2,01 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ byl pak podělen podle rovnice (17) směrnicí ze závislosti přirozeného logaritmu na čase (Obr. 33) a tím je získána konstanta difúzní cely β :

$$\beta = \frac{D_{\text{int}}}{4,8 \cdot 10^{-5}} = 2,39 \cdot 10^4 \text{ m}^{-2}. \quad (19)$$

Výše uvedeným matematickým výpočtem byla stanovena konstanta difúzní cely β , která slouží k výpočtu difúzního koeficientu jakožto hlavního parametru charakterizujícího transport lignohumátu přes rostlinné kutikuly. Tato konstanta bude odlišná pro různé geometrie difúzních cel, proto je nutné ji vždy pro difúzní experimenty stanovit zvlášť. Konstanta je pak využita pro výpočet difúzního koeficientu LH dle rovnice (8).

Výpočet byl určen dle reference [52], kde $\beta = 6 \cdot 10^4 \text{ m}^{-2}$. Určená konstanta difúzní cely v rámci této diplomové práce se liší pouze v řádech jednotek, což bylo zapříčiněno rozdílnou geometrií použité difúzní cely, z čehož bylo usouzeno, že postup stanovení β byl správný.

5.7.2 Kalibrační řada lignohumátu draselného

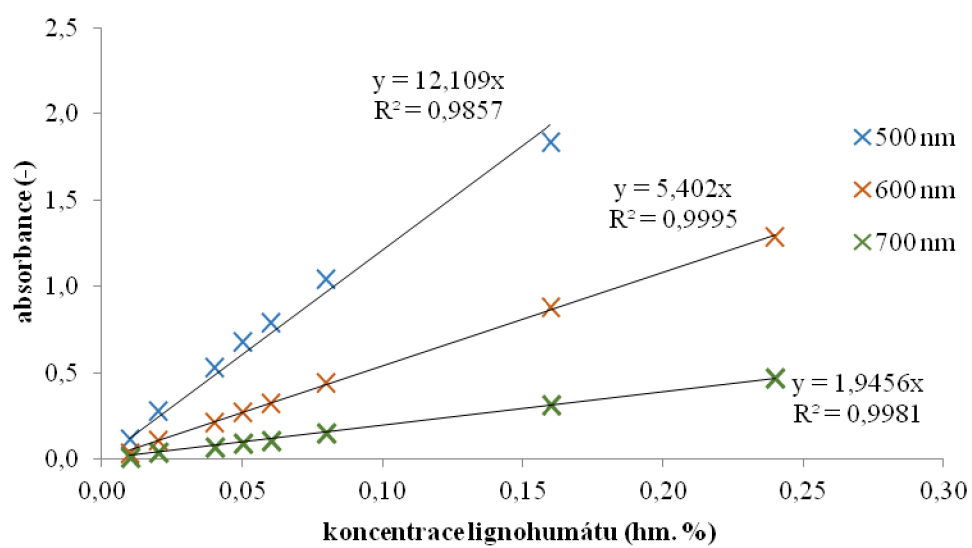
Lignohumát draselný ve formě roztoku vykazuje hnědé zbarvení, čehož lze využít při použití spektrofotometrie jako analytické metody při určení koncentrace. Ředěním roztoku Lignohumátu A o koncentraci 1 hm. % byla do 50 ml odměrných baněk připravena koncentrační řada. Kalibrační roztoky byly proměřeny spektrofotometrem OceanOptics v rozsahu vlnových délek 300–900 nm (měřeno kontinuální UV-VIS spektrum). Komunikace a převod dat byl zajištěn softwarem SpectraSuite.



Obr. 35: Kalibrační řada LH (0,01; 0,02; 0,04; 0,05; 0,06;0,08; 0,16;0,24;0,40;0,50 hm. %, zleva).

Pro sestavení kalibrační přímky byly vybírány absorbance při vlnových délkách 500 nm, 600 nm a 700 nm, kde byly naměřeny vhodné koncentrační závislosti absorbance pro LH. Při nižších vlnových délkách byly naměřeny vysoké citlivosti pro velmi nízké koncentrace a závislost nebyla lineární a pro vlnové délky vyšší než 700 nm byla citlivost pro vybrané koncentrace naopak velmi nízká. Směrnice vybraných kalibračních přímek pak byly výchozí pro výpočet koncentrace LH v přijímací komoře difúzní cely.

Na spektrofotometru byla naměřena data v rozmezí koncentrací 0,01 až 0,24 hm. %, více koncentrované roztoky už nebyly měřitelné vláknovým spektrofotometrem, protože vykazovaly příliš vysoké hodnoty absorbancí. Všechny tři přímky a jejich směrnice jsou znázorněny na Obr. 36.



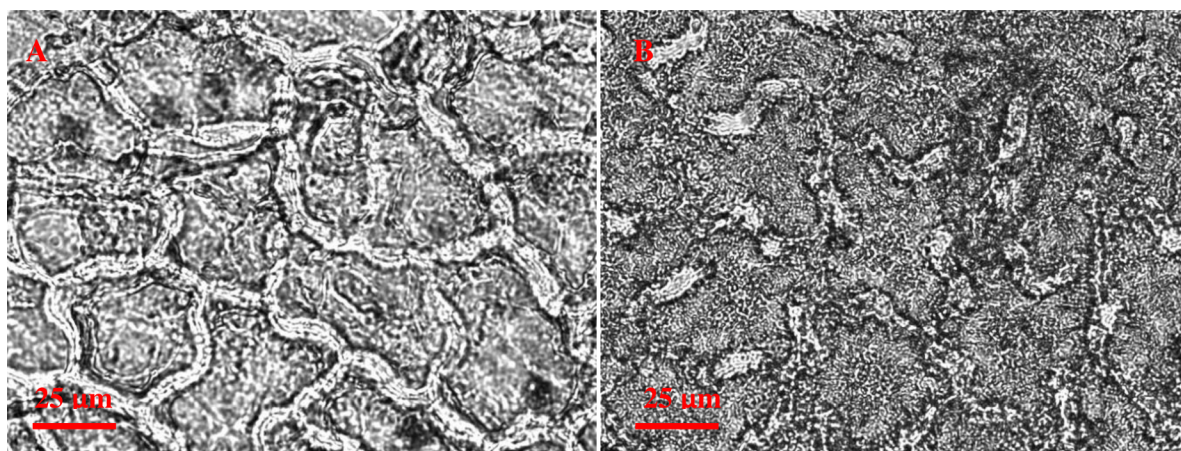
Obr. 36: Kalibrační přímky pro stanovení koncentrace LH.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Optická mikroskopie kutikul

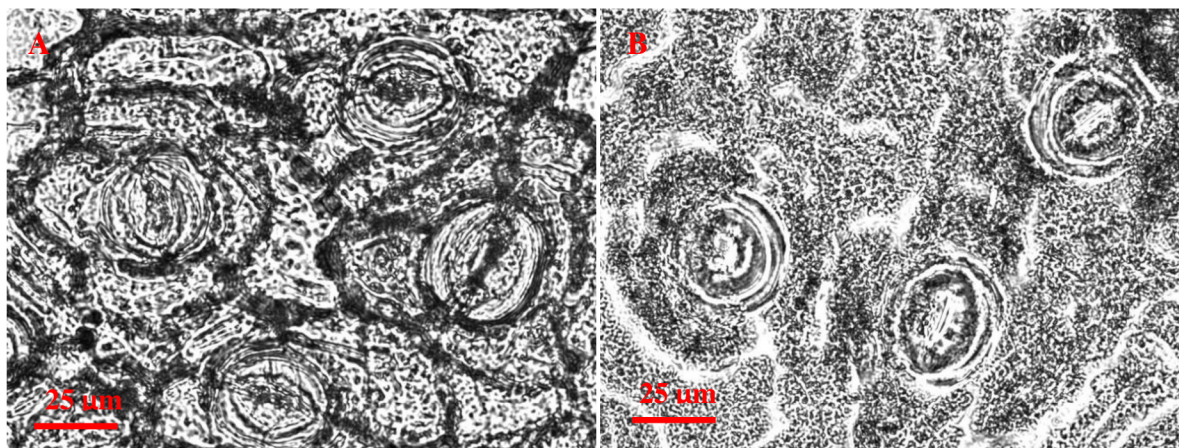
K transportním experimentům byly využity kutikuly bobkovišně lékařské a rajčete jedlého. Zmíněné kutikuly bobkovišně byly izolovány dvěma metodami – chemickou a enzymatickou. Jak je známo z předchozích publikací [44] a [65] kutikuly bobkovišně se liší z horní a spodní strany listu, kdy spodní kutikula obsahuje ve své struktuře stomata, která jsou důležitým faktorem ovlivňující průchod plynů, vody a aktivních látek do mezofylu listu. Bylo očekáváno, že stomata budou mít zásadní vliv také na transportní experimenty prováděné v rámci této diplomové práce.

Metoda optické mikroskopie byla použita jako výchozí metoda k sledování izolovaných kutikul bobkovišně a rajčete dvěma metodami (CHMI a EMI). Kutikuly bobkovišně byly pozorovány za účelem rozdělení na adaxiální (horní) a abaxiální (spodní) strany. Pro srovnání rozdílů mezi CHI a EI kutikulami byly pořízeny následující snímky za pomoci optického mikroskopu ve zvoleném 60 násobném zvětšení a jejich rozlišení bylo $1\,376 \times 1\,038$ pixelů. Měřítka na snímcích znázorňuje $25\ \mu\text{m}$. Bylo usouzeno, že pomocí optické mikroskopie nebylo možné s jistotou sledovat strukturní detaily a rozdíly mezi jednotlivými kutikulami izolovanými odlišnými způsoby. Průkazně však byla sledována stomata na spodní straně kutikuly bobkovišně. Detailní struktura a rozdíly kutikul bobkovišně a kutikul rajčat byla pozorována pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (kap. 6.2).



Obr. 37: Horní kutikula bobkovišně izolovaná chemicky (A) a enzymaticky (B).

Na Obr. 37 jsou uvedeny snímky horní kutikuly izolované chemickou metodou izolace (A) a enzymatickou metodou izolace (B). Horní kutikula bobkovišně má ve své struktuře pozorovatelné antiklinální stěny rovného typu. Pozorováním horních kutikul bylo také potvrzeno, že ve své struktuře neobsahují zmíněná stomata. Ze snímků je dále patrné, že u CHI kutikul jsou antiklinální stěny výraznější než u EI kutikul.



Obr. 38: Spodní kutikula bobkovišně izolovaná chemicky (A) a enzymaticky (B).

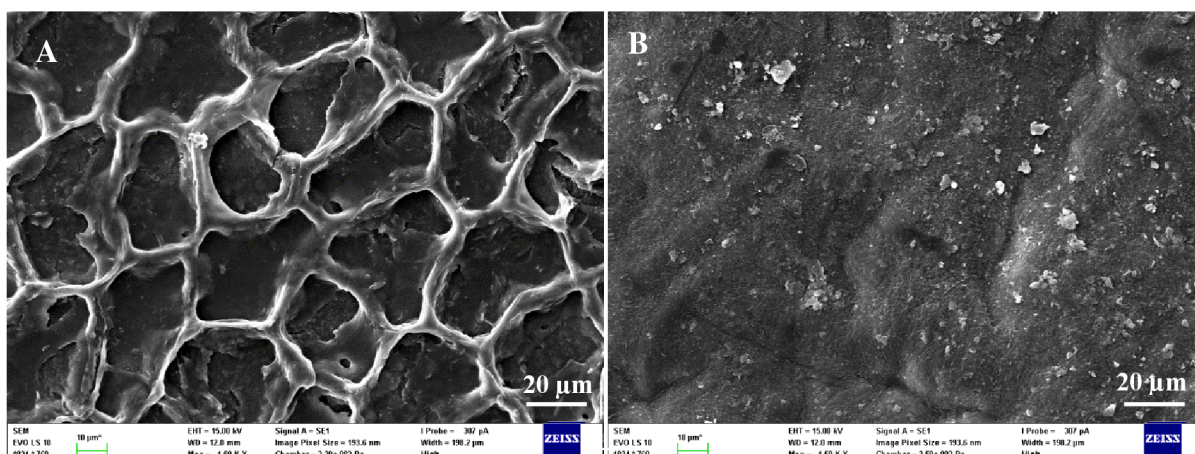
Snímky spodních kutikul chemicky izolovaných (A) a enzymaticky izolovaných (B) jsou zachycené na Obr. 38. Kromě antiklinálních stěn jsou zřetelně vidět stomata na obou uvedených snímcích. Antiklinální stěny jsou výraznější na snímku A, tedy stejně jako v případě horních kutikul. Rozmístění stomat je zcela nahodilé, avšak jejich přítomnost značně ovlivňuje procesy transpirace a výměnu plynů do listů rostlin.

6.2 Rastrovací elektronová mikroskopie kutikul

Pro detailnější zachycení rostlinných kutikul bobkovišně a rajčete z vnější a vnitřní strany, kde vnější strana čelí atmosféře a vnitřní navazuje na rostlinná pletiva, byla využita rastrovací elektronová mikroskopie. Zároveň byly sledovány rozdíly v kutikulách izolovaných chemicky a enzymaticky, jelikož metody izolace mají vliv na vlastnosti kutikul, které by mohly ovlivnit difúzní procesy. Při CHMI dochází k rozpouštění pektinu, který je vázán na kutin, ale při EMI zůstává pektin ve struktuře kutikuly. Tento fakt byl součástí pozorování kutikul pomocí SEM.

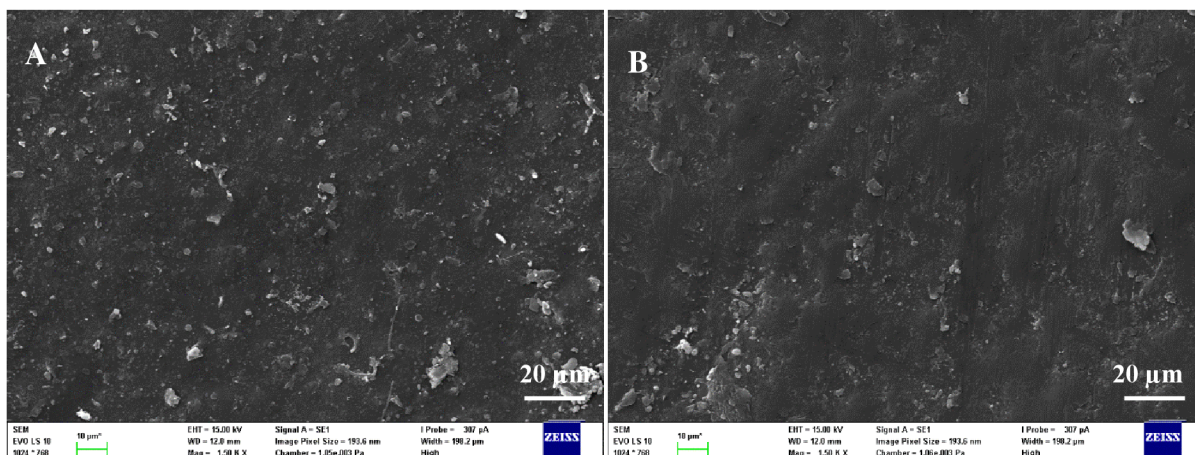
6.2.1 Detailní snímky kutikul bobkovišně ze SEM

Na Obr. 39 je zaznamenán povrch horní kutikuly bobkovišně izolované CHMI, na obrázku A je zachycena vnitřní strana a B zachycuje vnější stranu kutikuly. Z vnitřní strany kutikuly vystupují rovné antiklinální stěny a mezi nimi je povrch tvořený zbytky polysacharidů navázaných na kutin. Vnější strana má celistvý a hladký povrch, na kterém ulpívají drobné nečistoty, které zbyly na kutikule po nedokonalém očištění.



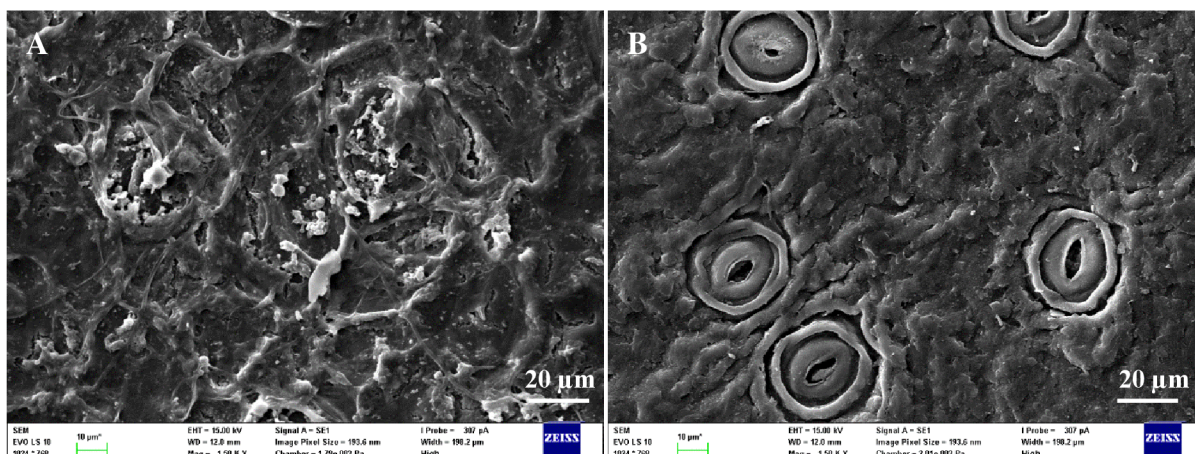
Obr. 39: Snímky vnitřní strany (A) a vnější strany (B) CHI horní kutikuly bobkovishň zvětšené 1500 \times .

Na Obr. 40 je zachycen snímek horní EI kutikuly bobkovishň. Část A zobrazuje vnitřní stranu a B vnější stranu horní kutikuly. Vnější i vnitřní strana kutikuly má stejný celistvý povrch s mírným reliéfem. Odlišnosti byly zaznamenány pouze v množství nečistot, které více ulpěly na vnitřní straně kutikuly. Opět se jedná o zbytky pletiv listu, které nebyly z kutikuly očištěny.



Obr. 40: Snímky vnitřní strany (A) a vnější strany (B) EI horní kutikuly bobkovishň zvětšené 1500 \times .

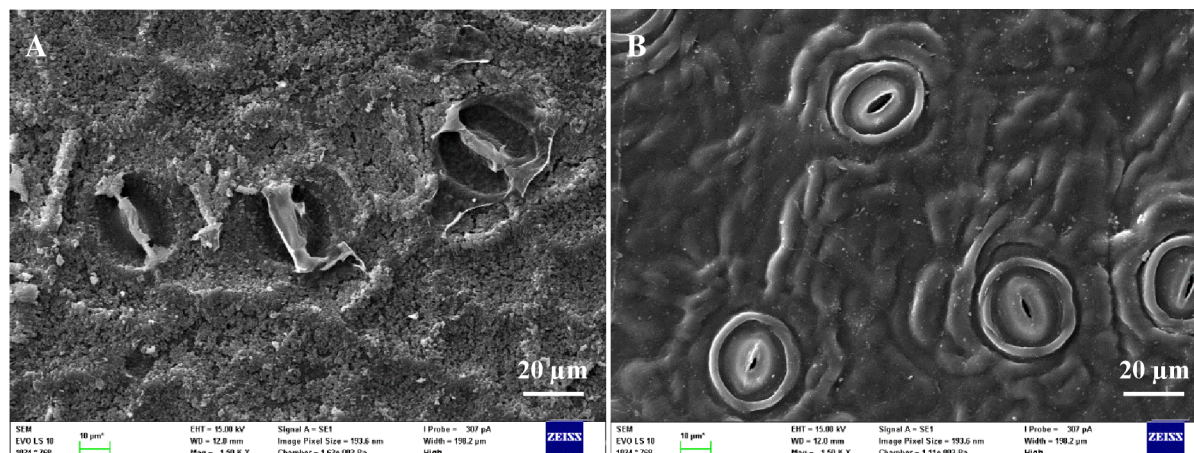
Na Obr. 41 je vnitřní a vnější strana spodní kutikuly bobkovishň získaná pomocí CHMI. Součástí této strany kutikuly bobkovishň jsou stomata, která jdou zřetelně vidět z vnější strany. Na vnitřním povrchu kutikuly opět výrazněji vystupují antiklinální stěny, avšak nejsou výrazné, jako tomu bylo u vnitřní strany horní kutikuly. Vnitřní povrch kutikuly společně se stomaty pokrývají nedokonale rozpuštěné zbytky mezofylu listu. Vnější povrch kutikuly je celistvý s mírným reliéfem. Velikost průduchových štěrbin CHI spodní kutikuly bobkovishň nabývala hodnot $(14,12 \pm 1,16) \mu\text{m}$ [65].



Obr. 41: Snímky vnitřní strany (vlevo) a vnější strany (vpravo) CHI spodní kutikuly bobkovišně zvětšené 1500 \times .

Na Obr. 42 je vnitřní strana (A) a vnější strana (B) spodní kutikuly bobkovišně získaná pomocí EMI. Stomata přítomná na kutikule jsou viditelná z obou stran, na vnitřním povrchu je ale více viditelné zbylé pletivo listu ulpívajícím na stomatech. Velikost průduchových štěrbin nabývala hodnot $(13,00 \pm 1,16)$ μm , což v rámci statistické chyby odpovídá velikostem stomat vypočteným pro kutikuly bobkovišně izolovaných CHMI [65].

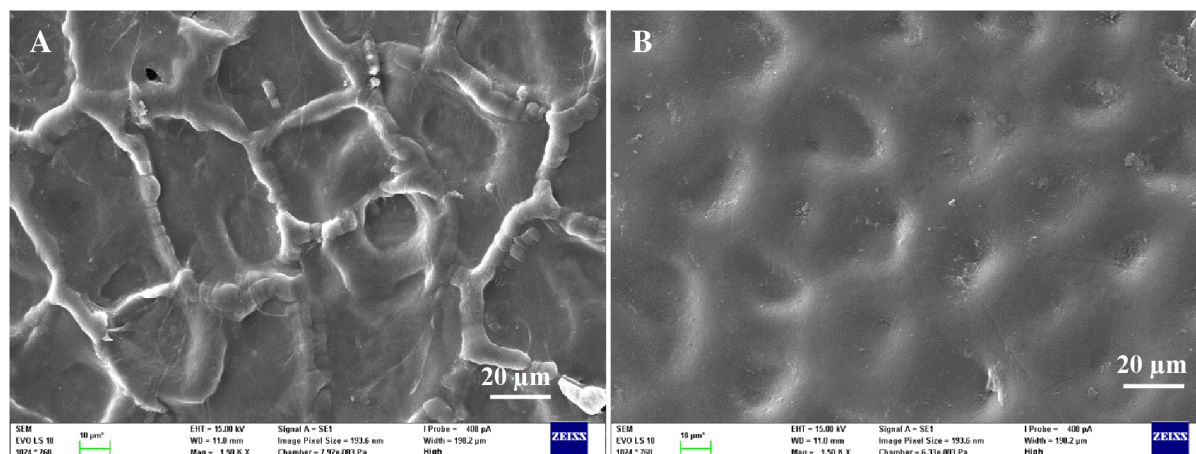
Ze získaných snímků kutikul byl zjištěn zřejmý vliv metody izolace na povrch a strukturu rostlinných kutikul, ale nebyl zjištěn vliv na velikost stomat. V případě transportních experimentů by tedy průduchy neměly hrát významnou roli v ovlivňování difúzi.



Obr. 42: Snímky vnitřní strany (A) a vnější strany (B) EI spodní kutikuly bobkovišně zvětšené 1500 \times .

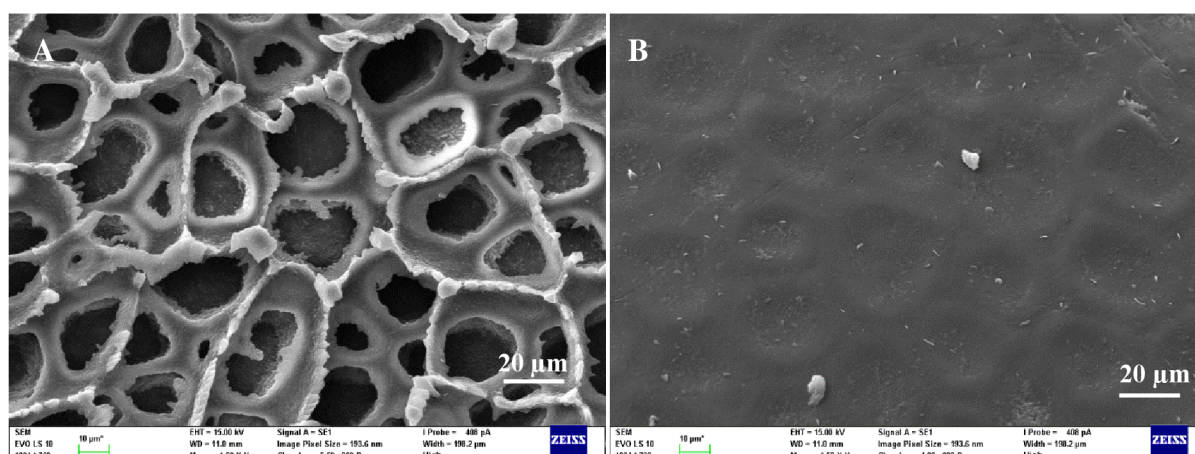
6.2.2 Detailní snímky kutikul rajčete ze SEM

Pro porovnání se snímky z předchozí kapitoly byly vytvořeny také snímky kutikuly rajčete jedlého, aby bylo získáno více informací o struktuře kutikuly, která by mohla mít podobný vliv na transportní experimenty, jako je tomu u bobkovišně. Kutikuly rajčete jedlého nemají ve své struktuře stomata, podobně jako horní kutikuly bobkovišně. I v tomto případě se kutikuly mohou strukturně lišit v závislosti na metodě izolace, CHMI a EMI. Stejně tak byly pozorovány výrazné rozdíly ve vnitřním a vnějším povrchu kutikul, kdy vnější strana obsahuje více lipofilních látek a je celistvější, než strana vnitřní, která navazuje na mezofyl.



Obr. 43: Vnitřní strana (A) a vnější strana (B) CHI kutikuly rajčete jedlého zvětšeného 1500 \times .

Na Obr. 43, je zobrazena vnitřní část A a vnější část B kutikuly rajčete získané pomocí CHMI. Antiklinální stěny podobně jako u bobkovišně vystupují výrazněji na vnitřní straně kutikuly a vnější strana je celistvá, jak již bylo zmíněno výše. Na snímku vnitřního povrchu je také vidět porušení kutikuly, na což je třeba dávat pozor při přípravě difúzních experimentů, proto byly kutikuly před přípravou difúzních experimentů důkladně prozkoumány.



Obr. 44: Vnitřní strana (A) a vnější strana (B) EI kutikuly rajčete jedlého zvětšeného 1500 \times .

Na Obr. 44 je vnitřní a vnější strana kutikuly rajčete jedlého získaná pomocí EMI. Vnější povrch kutikuly je stejně jako v předešlém případě celistvý. Na snímku vnitřního povrchu kutikuly je však oproti CHI kutikule vidět výrazná členitost antiklinálních stěn. Na rozdíl od kutikul bobkovišně, kde byly více členité CHI kutikuly. Důvodem může být pružnost a měkkost mezofylu rajčete ve srovnání s listem bobkovišně, díky čemuž došlo k lepšímu působení enzymů a rozpuštění zmíněného pletiva.

6.3 Profilometrické měření kutikul

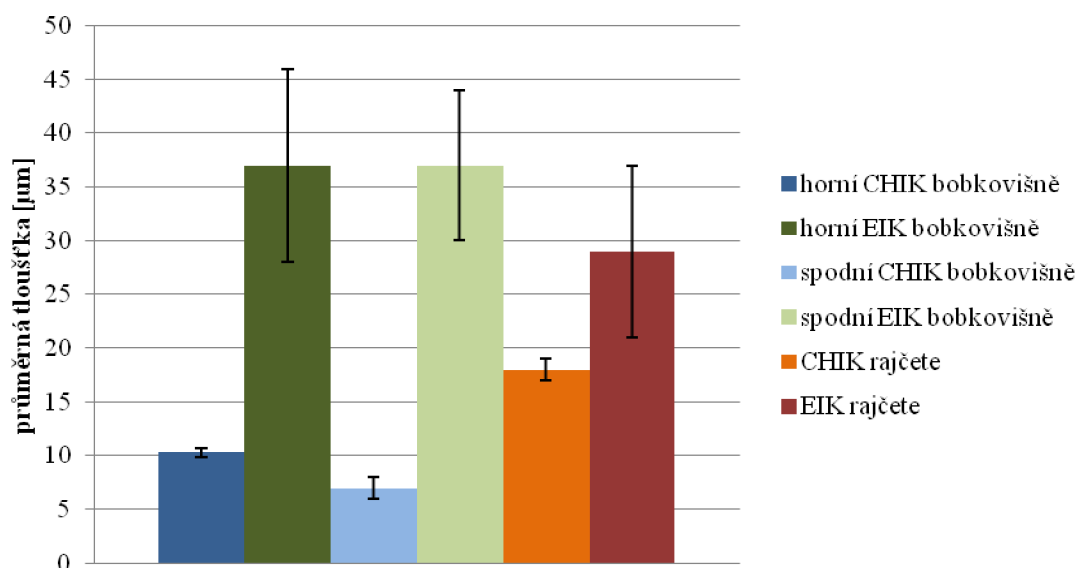
Z naměřených dat byly zjištěny tloušťky kutikul, které shrnuje Tab. 4. Data byla získána výpočtem průměru z 5 měření vzorků kutikul, která byla vyhodnocena jako relevantní.

Pomocí profilometrického měření 5 vzorků kutikuly bobkovišně byla stanovena průměrná tloušťka, jejíž hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4. Z 5 naměřených vzorků byla získána kromě průměrné tloušťky také odchylka, která byla větší u EI kutikul, což naznačuje jejich větší heterogenitu.

Tab. 4: Tloušťky kutikul stanovených pomocí profilometrie.

	bobbkovišeň lékařská [μm]				rajče jedlé [μm]	
	horní		spodní		CHMI	EMI
	CHMI	EMI	CHMI	EMI		
průměr	10,3	37	7	37	18	29
odchylka	0,4	9	1	7	1	8

Kutikuly rajčete získané různými metodami izolace se stejně jako kutikuly bobbkovišně svou tloušťkou lišily. Kutikuly bobbkovišně získané pomocí CHMI byly 4× tenčí, než EI kutikuly bobbkovišně. CHI kutikula rajčete byla pouze 0,3× než EI kutikula rajčete, z čehož vyplývá rozdílný vliv izolačních směsí na kutikuly bobbkovišně a rajčete. Bylo usouzeno, že kutikuly rajčat se svou strukturou podobají horním kutikulám bobbkovišně, jelikož ve své struktuře neobsahují stomata. Průměrná hodnota tloušťky kutikuly rajčete je na rozmezí CHI a EI horních kutikul bobbkovišně, od čehož by se měl odvíjet i podobný průběh transportních experimentů. Průměrné tloušťky s odchylkami jsou názorně uvedeny v grafu na Obr. 45.



Obr. 45: Průměrné tloušťky chemicky izolovaných kutikul (CHIK) a enzymaticky izolovaných kutikul (EIK) měřené pomocí profilometrie.

Rozdílnost v naměřených tloušťkách je zapříčiněna rozdílnou strukturou a poměrem hydrofobních vosků a hydrofilních sacharidů v kutikulách. Z metody izolace souvisí také homogenita izolované kutikuly. CHMI je založena na agresivním působení HCl, která rychleji rozkládá mezofyl listu společně s polysacharidy vázanými ke kutikule, na rozdíl od izolačního roztoku EMI, který rozkládá pletiva pomaleji, což také zapříčiňuje tvorbu heterogenního povrchu EI kutikul. Uvedené výsledky také korelují se snímky získanými pomocí rastrovací elektronové mikroskopie v kap. 6.2, kde byla porovnávána sledována výrazná členitost EI kutikul oproti CHI kutikulám rajčete. Jedná se o významný strukturní rozdíl, který by mohl ovlivnit difúzní experimenty.

6.4 Základní charakterizace lignohumátu draselného

6.4.1 Povrchové napětí roztoku LH

Povrchově aktivní látky (PAL) se běžně přidávají do listových hnojiv, jelikož zvyšují adhezi AI k hydrofobnímu povrchu listu. Kapky aplikovaného hnojiva pak déle setrvávají na listu a rostlina má více času AI pojmout. Je všeobecně známo, že huminové látky ve své struktuře obsahují hydrofilní funkční skupiny a díky tomu jsou považovány za povrchově aktivní. V rámci této diplomové práce bylo pracováno s lignohumátem draselným jako zástupcem HL. Naměřené hodnoty tenze roztoků LH jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Hodnoty tenze roztoků LH o různé koncentraci.

koncentrace LH [hm. %]	1	5	10
průměrná tenze [mN/m]	51,2	48,1	41,2
odchylka [mN/m]	0,4	0,2	0,3

Tabulková hodnota pro povrchové napětí vody je 72 mN/m. Z tabulky (Tab. 5) je patrné, že povrchové napětí klesá se vzrůstající koncentrací LH v roztoku, čímž bylo potvrzeno, že lignohumát draselný je povrchově aktivní látka. Zároveň může být tvrzeno, že s rostoucí koncentrací LH v roztoku bude docházet k ochotnějšímu příjmu AI aplikované na list do vnitřní struktury listu bez přidání dalších syntetických PAL, které mnohdy působí negativně na životní prostředí.

6.4.2 Vodivost a pH roztoku LH

Vodivost a pH byly měřeny vždy pro roztoky LH o koncentraci 5 hm. % a 10 hm. %. Výsledky průměrných hodnot měření jsou uvedeny v Tab. 6. Naměřené hodnoty vodivosti pro vzorky LH o koncentraci 10 hm. % byly přibližně 1,8× vyšší než u 5 hm. % LH. Vyšší elektrická vodivost je přisuzována většímu množství draselných iontů v koncentrovanějším roztoku. Draselné kationty jsou malé částice, které budou snadno difundovat kutikulou, a při vyšší koncentraci se vytvoří větší koncentrační gradient, čímž dojde k jejich rychlejšímu přechodu.

Při měření pH roztoků LH bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací lignohumátu draselného nedochází k nárůstu hodnot pH. Naměřené hodnoty pH se pohybovaly okolo 9,5, což znamená, že se jedná o mírně alkalické rostlinné přípravky.

Tab. 6: Naměřené hodnoty vodivosti a pH pro roztoky LH.

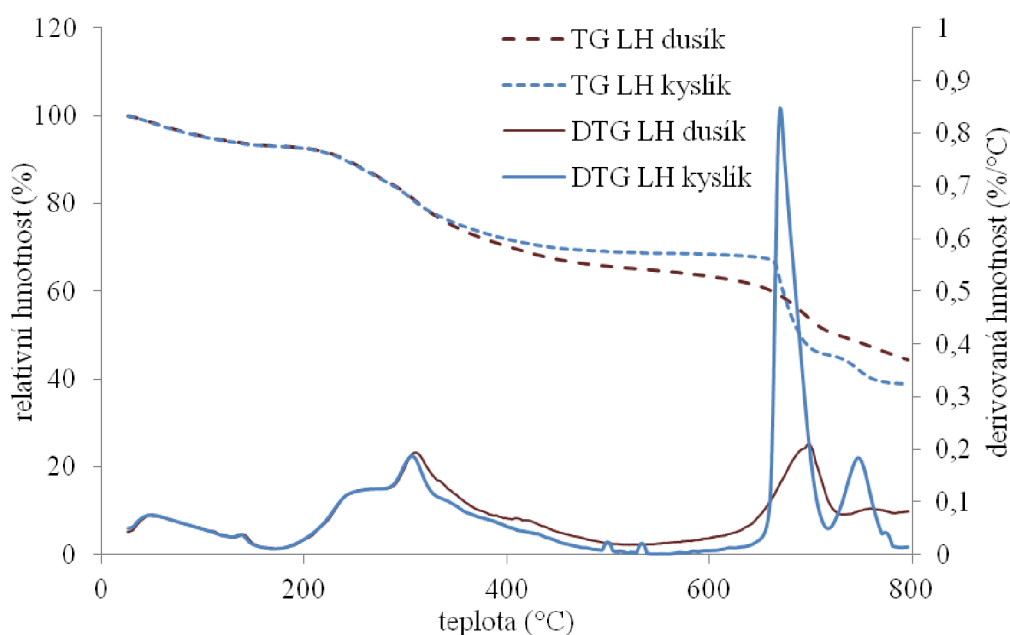
koncentrace [hm. %]	vodivost [mS/cm]		pH	
	5	10	5	10
průměr	19,6	34,9	9,45	9,39
odchylka	0,02	0,3	0,06	0,01

6.4.3 Termogravimetrická analýza LH

Termogravimetrická analýza (TGA) pro komerční vzorek Lignohumátu A byla využita jako základní charakterizace použitého lignohumátu draselného. Pomocí měření bylo zjišťováno množství čisté AI, která se v komerčním práškovém přípravku nachází. Pomocí TGA mohou být kromě úbytku hmotnosti vzorku působením teploty zjištěny také oxidační vlastnosti látky

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

Naměřená závislost tepelného rozkladu LH je zobrazena na Obr. 46. Na ose y je znázorněna hmotnost vzorku, kdy 100 % značí hmotnost původního vzorku. V inertní i kyslíkové atmosféře je možné sledovat úbytek hmotnosti do 140 °C, což značí odpaření vody ze vzorku, z tohoto úbytku lze stanovit původní vlhkost LH. K následné degradaci dochází při teplotách 300 °C (nizkoteplotní oblast) a 700 °C (vysokoteplotní oblast). Z konečné hodnoty spáleného materiálu je možné určit množství popela.



Obr. 46: Závislost úbytku hmotnosti LH na teplotě. Modré křivky znázorňují tepelný rozklad roztoku v proudu kyslíku a černé křivky v proudu dusíku.

Do Tab. 7 byly shrnuty naměřené vlhkosti ve vzorku LH měřené v kyslíkové i v dusíkové atmosféře. Bylo zjištěno, že měřený vzorek obsahoval kolem 6 % vlhkosti. V pyrolytické atmosféře pak po degradaci vzniklo více popela (44,4 %) než v oxidativní atmosféře (40,0 %). Popel je tvořen nespalitelnými zbytky. Z rozdílu obsahu vlhkosti a vzniklého popela bylo vypočítáno množství čistého LH přibližně 50 %.

Tab. 7: Procentuální množství vlhkosti ve vzorku LH a popela vzniklého po jeho degradaci.

	O ₂	N ₂
Vlhkost (hm. %)	6,2	6,3
Popel (hm. %)	40,0	44,4
Obsah LH	53,8	49,3

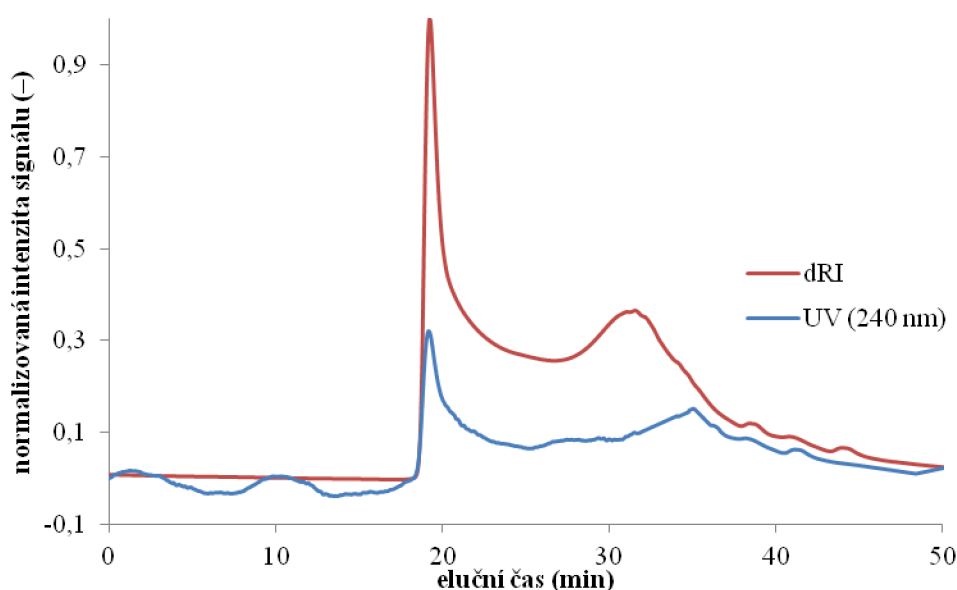
6.4.4 Určení molekulární hmotnosti LH pomocí SEC-UV-dRI

Pomocí uvedené metody byla zjišťována molekulová hmotnost použitého LH. Naměřená data pak byla využita pro získání informace o velikosti molekul a supramolekul LH, které mohly být v rámci transportních experimentů zadržovány v pórech kutikul.

Molekulová hmotnost byla určena relativně vzhledem ke kalibraci kolony na polystyrenové standardy (polystyren sulfonát) o přesně definované molekulové hmotnosti. Naměřené hodnoty hmotnostně střední molární hmotnosti (M_w), početně střední molární hmotnosti (M_N) a indexů polydisperzity (PDI) pro měření tří vzorků LH o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ jsou uvedeny v Tab. 8. Naměřené intenzity signálu pro oba detektory jsou zobrazeny v grafu na Obr. 47.

Tab. 8: Hodnoty střední molární hmotnosti, početně střední molární hmotnosti a indexů polydisperzity pro vzorky LH o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

	SUPRAMOLEKULY			MOLEKULY			
	M_w (Da)	M_N (Da)	PDI	měření	M_w (Da)	M_N (Da)	PDI
průměr	38 051	34 256	1,11	průměr	773	239	3,2
smodch	2 135	3 199	0,05	smodch	12	19	0,2



Obr. 47: Intenzita signálu použitých detektorů v elučním čase kolony.

Hmotnostně střední molární hmotnost neboli hmotnostní průměr molárních hmotností pro supramolekuly LH byla $(38\,051 \pm 2\,135) \text{ Da}$, početně střední molární hmotnost byla $(34\,256 \pm 3\,199) \text{ Da}$. Z jejich podílu byl vypočítán index polydisperzity $(1,11 \pm 0,05)$ a můžeme tak očekávat nízkou polydisperzitu systému. Pro hodnoty hmotnostní molekuly LH vycházel PDI $(3,2 \pm 0,2)$, což naznačuje více polydisperzní systém.

Z měření bylo odvozeno, že velikost molekul LH se pohybuje v řádu jednotek nm, tvoří tedy koloidní roztok. Podle daných výsledků tedy dochází v rostlinných kutikulách k snadnému transportu LH a experimenty nejsou velikostí molekul ovlivněny. Vzhledem k tomu, že velikost pórů na spodní kutikule bobkovišně odpovídá cca $13 \mu\text{m}$, tedy její průměr je přibližně $1\,000\times$ větší než velikost molekul LH, ani z tohoto hlediska by nemělo docházet k ovlivňování difúzních experimentů.

6.5 Souhrn měření difúze KCl v horizontálních difúzních celách

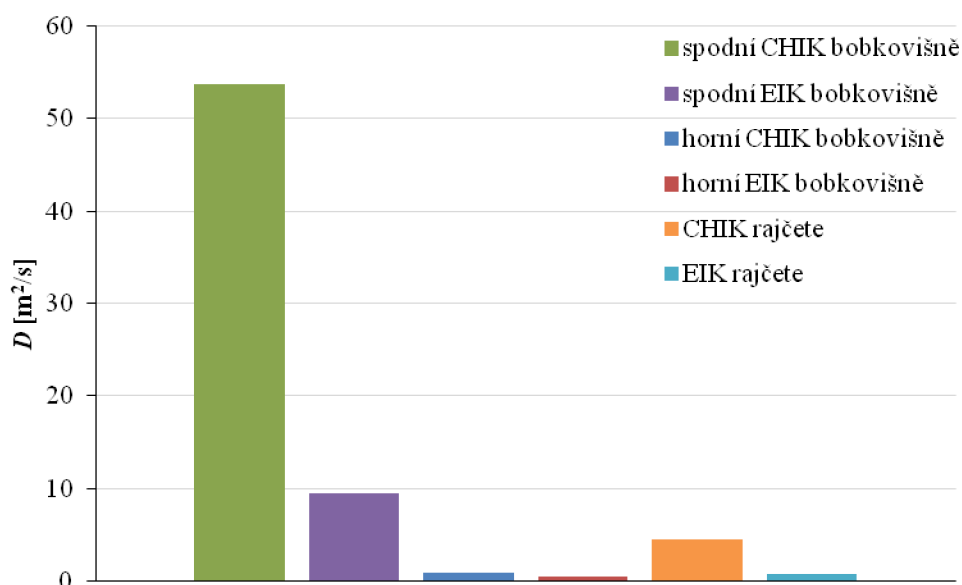
Pomocí konduktometrie byla měřena difúze iontů KCl jako kontrola průběhu transportu přes připravené kutikuly zalité v pryskyřici. Díky malé (analytické) velikosti zmíněných iontů dochází k rychlému transportu přes membrány, experimenty proto nevyžadovaly tolik času jako transportní experimenty s LH. Zároveň bylo využito již určené kalibrační přímky pro stanovení KCl metodou měření vodivosti, jak je uvedeno v kap. 5.7.1. Ve zmíněné kapitole byl také proveden výpočet difúzního koeficientu pro nitrocelulóзовou membránu o velikosti pórů $0,4 \mu\text{m}$, jehož hodnota byla $D_{\text{int}} = 2,0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. Tato hodnota koreluje s hodnotou difúzního koeficientu KCl uvedeného v publikaci [64].

Difúze KCl byla stanovena pomocí měření vodivosti v přijímací komoře difúzní cely. Zdrojovým roztokem byl zvolen $0,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl a difúzní koeficient byl určen výpočtem vycházejícím z rovnice (8). Experimenty probíhaly přes 5 vrstev izolovaných kutikul bobkovišně, což nejlépe simuluje stavbu listu, jak již bylo zmíněno v kap. 5.6.1 a stejný počet vrstev kutikul bobkovišně byl také využíván pro difúzní experimenty s LH.

Vypočtené difúzní koeficienty pro transport $0,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl přes horní a spodní chemicky izolované kutikuly (CHIK) bobkovišně, horní a spodní enzymaticky izolované kutikuly (EIK) bobkovišně a kutikuly rajčat jsou shrnuty v Tab. 10. Jejich hodnoty jsou pro srovnání znázorněny v grafu na Obr. 48. Příklad výpočtu difúzního koeficientu je uveden níže v kap. 6.6.1.

Tab. 9: Vypočítané hodnoty difúzních koeficientů a časů průchodu $0,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl přes jednotlivé kutikuly.

	BOBKVIŠEŇ				RAJČE	
	CHI		EI		CHI	EI
	horní	spodní	horní	spodní		
$D [10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}]$	0,85	53,76	0,52	9,51	4,56	0,72



Obr. 48: Difúzní koeficienty KCl pro transportní experimenty přes jednotlivé kutikuly.

Ve všech případech použitých kutikul byl difúzní koeficient menší než D_{int} , který byl stanoven v řádech 10^{-9} m²/s. Nejvíce se hodnotě D_{int} blížila hodnota difúzního koeficientu pro transport přes spodní CHI kutikulu bobkovišně. Pro bobkovišně platilo, že nejrychleji tedy probíhal transport přes spodní CHI kutikulu, rychlý byl také transport pro spodní EI kutikulu a po nich následovaly horní CHI kutikuly a EI horní kutikuly. Zjištěné D dosáhly vyšších hodnot pro spodní kutikuly v porovnání s horními pro obě metody izolace kutikul bobkovišně, což je způsobeno přítomností stomat na spodních kutikulách.

Výsledky rovněž korelují s daty pro tloušťku kutikul (Tab. 4), kde CHI spodní kutikula byla nejtenčí. Horní i spodní EI kutikuly byly silnější než kutikuly CHI, což opět koresponduje s dosaženými výsledky uvedených difúzních koeficientů, kdy D pro EI kutikuly byly nižší než D pro CHI kutikuly.

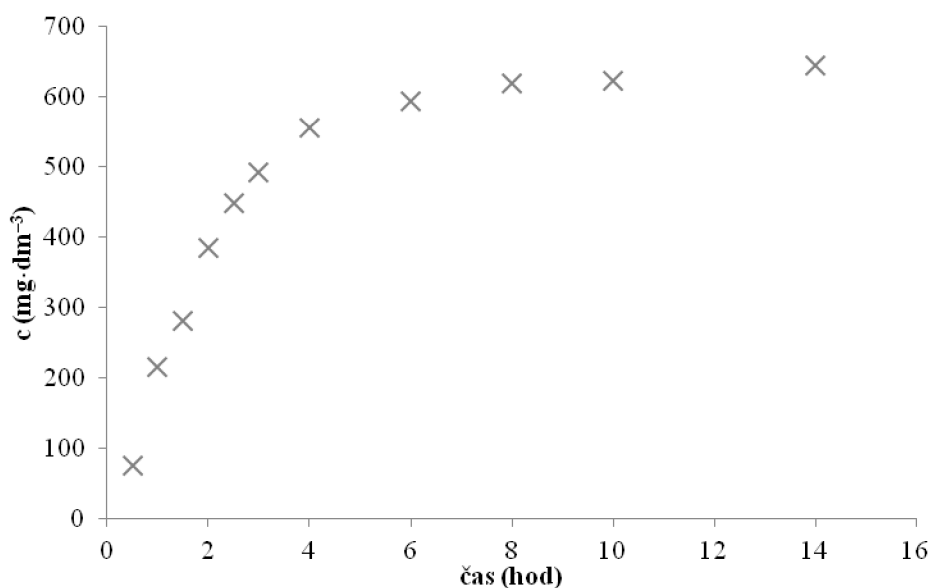
Pro izolované kutikuly rajčete, které jsou svou strukturou podobné více horním kutikulám, byly zjištěny difúzní koeficienty o velikosti ve stejných číselných řádech. Zejména pro EI kutikulu rajčete byl zjištěn koeficient na rozmezí CHI horní kutikuly a EI horní kutikuly, což koreluje i s naměřenými hodnotami pro tloušťky kutikul mechanickou profilometrií.

6.6 Souhrn měření difúze LH v horizontálních difúzních celách

K měření byly použity Stokesovy horizontální difúzní cely. Experimenty slouží jako optimalizace studia transportu AI přes rostlinné kutikuly. V našem případě se jednalo u kutikuly bobkovišně lékařské a rajčete jedlého. V budoucnu by experimenty mohly sloužit pro studium transportu jiných AI (např. N, P, K) přes kutikuly dalších zemědělských plodin za účelem kvantitativního stanovení příjmu AI pomocí listů či plodů.

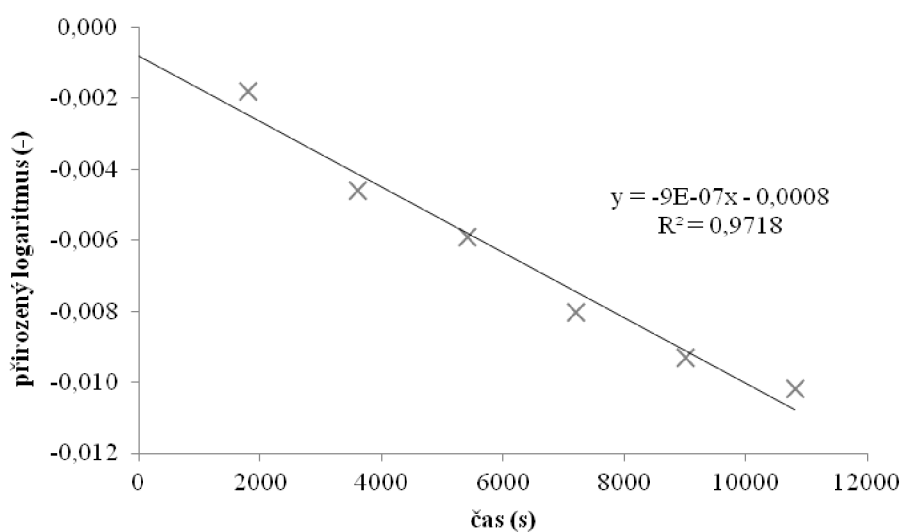
6.6.1 Výpočet difúzního koeficientu LH

V následujících odstavcích je uveden příklad stanovení difúzního koeficientu pro transportní experiment přes horní CHI kutikulu bobkovišně. Z průměrných hodnot absorbancí naměřených v přijímací komoře difúzní cely pomocí UV-VIS a z hodnot kalibrační křivky byla vypočtena změna průměrné koncentrace LH na čase, závislost je znázorněna na Obr. 49. Bylo zjištěno, že koncentrace LH v přijímací difúzní cele rostla lineárně (docházelo k lineární difúzi) a přibližně po 6 hodinách došlo k jejímu ustálení.



Obr. 49: Závislost koncentrace LH v přijímací komoře difúzní cely pro transportní experiment přes horní CHI kutikulu bobkovišně.

Pro výpočet difúzního koeficientu byla použita výchozí rovnice (8). Nejprve byl určen přirozený logaritmus zlomku rozdílů koncentrace ve zdrojové cele a koncentrace v přijímací cele v čase 0 a v čase t , kdy došlo k ustálení koncentrace. Závislost přirozeného logaritmu na čase byla v lineární části proložena přímkou (Obr. 50).



Obr. 50: Závislost přirozeného logaritmu koncentrace na čase.

Pomocí funkce LINREGRESE byly určeny ze zmíněné závislosti na Obr. 50 hodnoty koeficientů a , b , kde a odpovídá $\beta \cdot D$. Z rovnice $D = a / \beta$ byly zjištěny hodnoty difúzního koeficientu D a čas průchodu t lignohumátu draselného.

Experimenty byly nejprve provedeny přes celý list bobkovišně, který byl zalit v pryskyřici a to pro koncentraci 5 hm. % a později i 10 hm. % LH, jakožto zdrojového roztoku. LH však neprocházal přes silnou vrstvu mezofylu, jelikož nebyla v přijímací cele zaznamenána žádná koncentrační změna. Později byl vytvořen difúzní model 5 vrstev kutikul a pro srovnání

metodiky s experimenty M. Laštůvkové [65] byly měřeny difúze také pro 1 vrstvu. K transportním experimentům přes kutikuly bobkovišně byl využit LH o koncentraci 5 hm. %. Jednotlivé experimenty byly časově náročné z hlediska přípravy kutikuly (izolace, sušení a zalévání do pryskyřice), následné difúzní experimenty probíhaly až tři týdny. Některá nezdařená měření nebyla zahrnuta do výpočtů, protože docházelo k poškození kutikul, zejména u experimentů s menším počtem vrstev spodních kutikul bobkovišně, a tím pádem k pronikání LH mimo požadovanou plochu.

Horní kutikula bobkovišně byla pevnější, proto bylo umožněno měření přes 1 kutikulu, což nejlépe simuluje transport LH při foliárním hnojení do mezofylu listu. Bohužel experiment nebylo možné připravit pro 1 spodní kutikulu, z důvodu jejího opakovaného mechanického poškození. Řešením tohoto problému by bylo zmenšení plochy kutikuly, přes kterou difúze probíhala, ovšem k tomu je zapotřebí vhodně upravit nebo kompletně vyrobit novou teflonovou formu, což už z časových důvodů nebylo možné.

Výsledky zjištěných difúzních koeficientů a časů průchodu z naměřených dat pro jednotlivé kutikuly bobkovišně lékařské jsou shrnuty v Tab. 10.

Tab. 10: Shrnuté výsledky průměrných difúzních koeficientů a časů průchodu 5 hm. % LH přes kutikuly Bobkovišně lékařské.

	CHEMICKY IZOLOVANÉ				ENZYMATICKY IZOLOVANÉ			
	horní		spodní		horní		spodní	
	D [m^2/s]	t_p [hod]	D [m^2/s]	t_p [hod]	D [m^2/s]	t_p [hod]	D [m^2/s]	t_p [hod]
5 vrstev	$1,02 \cdot 10^{-14}$	18,7	$6,59 \cdot 10^{-12}$	0,7	$6,73 \cdot 10^{-15}$	59,2	$9,39 \cdot 10^{-13}$	2,8
1 vrstva	$3,86 \cdot 10^{-11}$	0,3			$1,55 \cdot 10^{-12}$	5,4		

Pro pětivrstevný systém dopadly výsledky následovně. Difúzní koeficienty pro spodní CHI kutikuly bobkovišně byly stanoveny o dva číselné řády vyšší než v případě horních CHI kutikul. Tyto výsledky korespondují i s hodnotami časů průchodu, kdy v případě spodní kutikuly došlo k průchodu za 42 minut, kdežto v případě horní kutikuly až o 18 hodin později.

Nápodobně tomu bylo v případě EI kutikul bobkovišně. Spodní kutikuly opět dosahovaly vyšších hodnot difúzního koeficientu, než tomu bylo v případě horních kutikul. Čas průchodu LH skrze spodní kutikulu byl stanoven na 2 hodiny a 48 minut, v případě horní EI kutikuly to bylo za 59 hodin a 12 minut. Rychlejší prostup LH skrze spodní kutikuly je podmíněn přítomnými stomaty, jak je uvedeno v kap. 5.4.

U CHI kutikul bobkovišně lze pozorovat vyšší hodnoty difúzních koeficientů a nižší časy přechodu lignohumátu draselného než u EI kutikul, což je způsobeno rozdílnými tloušťkami rostlinných kutikul, které byly měřeny profilometrií a její výsledky jsou sepsány v kap. 6.3. Menší tloušťky byly dosaženy v případě CHI kutikul, jelikož izolační směs pro CHMI se chová agresivněji ke kutikulám a zbavuje je kromě mezofylu také vázaných sacharidů. Výsledkem CHMI jsou pak tenčí kutikuly s více homogenním povrchem, než je tomu u EI kutikul. Z těchto důvodů dochází k rychlejšímu transportu AI přes CHI kutikuly, jak rovněž bylo zjištěno i v případě transportních experimentů s KCl.

Ve srovnání s difúzními koeficienty uvedenými v publikaci M. Laštůvkové [65], kde difúzní experimenty probíhaly v hydrogelových maticích, byly D pro CHI i EI kutikuly bobkovišně v řádech 10^{-10} m²/s. V případě předložené diplomové práce jsou D stanovené o jeden řád nižší, což je pravděpodobně způsobeno odlišným difúzním aparátem. Avšak stejně jako ve zmíněné publikaci, byl potvrzen trend ve stanovení difúzních koeficientů, kdy nejvyšší míry transportu bylo docíleno v případě spodních CHI kutikul, pak spodních EI kutikul, následně horních CHI a v poslední řadě horních EI kutikul.

Výsledky difúzních koeficientů a časů průchodu pro mechanicky izolované (MI), chemicky izolované (CHI) a enzymaticky izolované (EI) kutikuly rajčete jedlého jsou shrnuty v Tab. 11. K experimentům přes kutikuly rajčete byl zvolen 10 hm. % roztok LH, jelikož při použití 5 hm. % nebyl v průběhu doby měření zaznamenán žádný signál.

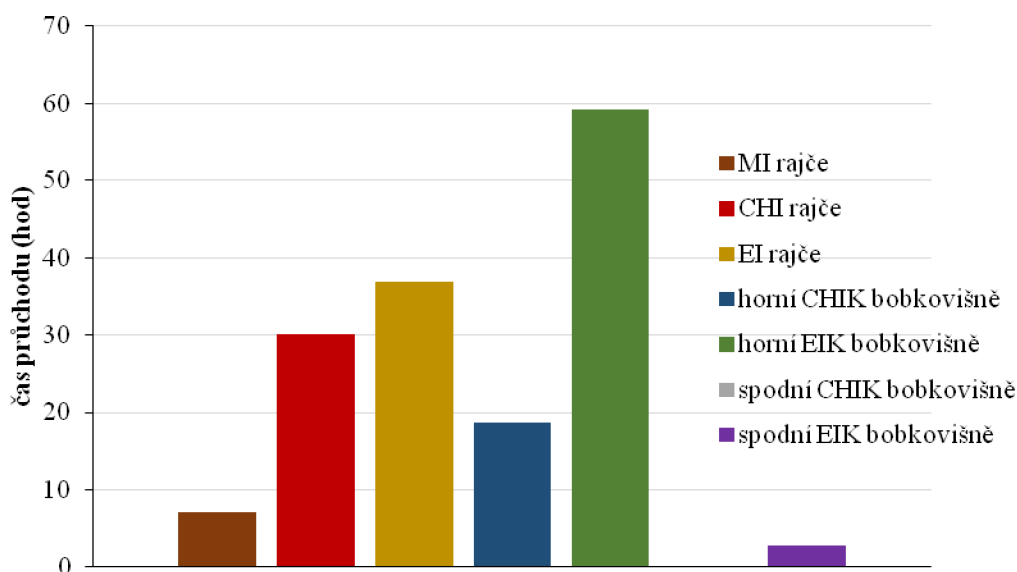
Tab. 11: Shrnuté výsledky difúzních koeficientů a časů průchodu LH přes kutikuly rajčete jedlého.

	MI	CHI	EI
D [m ² /s]	$4,96 \cdot 10^{-13}$	$2,7 \cdot 10^{-14}$	$2,09 \cdot 10^{-13}$
čas průchodu [hod]	7,1	30,2	36,9

Pro transportní experimenty přes kutikuly rajčat nebylo dosaženo stejných výsledků, jako tomu bylo v případě kutikul bobkovišně. Neboť, jak uvádí Tab. 11, LH přes EI kutikuly postupoval rychleji než přes CHI kutikuly, což navíc potvrzují i hodnoty časů průchodu. Difúzní koeficient pro CHI kutikuly byl o jeden číselný řád menší než pro EI a MI kutikuly. Jak bylo zjištěno metodou rastrovací elektronové mikroskopie (kap. 5.4.2), EMI byly získány kutikuly s členitějším povrchem, než tomu bylo u CHI kutikul a tak došlo k lepšímu prostupu LH skrze membránu. Co se týká rozdílů průchodu LH, nejnižší čas byl naměřen pro průchod přes MI kutikulu. Avšak tyto data jsou brána jako nevěrohodná, protože s největší pravděpodobností došlo k protržení membrány, což se i později potvrdilo důkladným prostudováním membrány pod optickým mikroskopem.

V porovnání s difúzními koeficienty, které byly naměřeny pro transport LH přes horní vrstvy kutikul bobkovišně, byly pro kutikuly rajčat difúzní koeficienty nižší. V rámci měření profilometrie kutikul bylo zjištěno, že kutikuly rajčat izolované oběma metodami izolace dosahovaly větší tloušťky než horní CHI bobkovišně, ale menší než horní EI bobkovišně. Z naměřených dat může být usouzeno, že kutikuly rajčat obsahují více vosků a méně sacharidů, tedy jsou více hydrofobní, a proto je transportované množství LH menší, než u kutikul bobkovišně.

Pro názorné srovnání byly hodnoty časů průchodu pro 5 vrstev kutikul bobkovišně a kutikuly rajčat vyneseny do grafu na Obr. 51. Bylo zjištěno, že LH nejrychleji procházel MI kutikulou rajčete a CHI spodní kutikulou bobkovišně, kde hodnoty časů přechodu jsou natolik nízké, že nejsou v grafu pozorovatelné.



Obr. 51: Časy průchodu LH přes jednotlivé kutikuly.

Hodnota času průchodu pro EI spodní kutikulu bobkovišně je přibližně 6× vyšší než pro CHI spodní kutikulu bobkovišně. Pro EI horní kutikuly bobkovišně je čas průchodu přibližně 3× vyšší než pro EI spodní kutikuly bobkovišně. Tyto výsledky korelují s přítomností stomat na spodní kutikule a taktéž s naměřenými daty pro tloušťky kutikul. Časy průchodů LH přes EI a CHI kutikuly rajčete se pohybují mezi časy průchodu LH skrz horní CHIK a EIK, což také koreluje s naměřenými pro tloušťky kutikul (kap. 6.3).

K měření byla optimalizována metoda měření transportních jevů pomocí Stokesových difúzních cel. Výše uvedená data (Tab. 10 a Tab. 11) byla provedena v rámci náplně této diplomové práce a slouží jako pilotní experimenty. Statisticky nebylo možné tyto výsledky potvrdit, z důvodu velké časové náročnosti difúzních experimentů, které nebylo možné v dotovaném čase vícekrát zopakovat. Avšak do budoucna bude problematika předmětem dalšího zkoumání.

7 ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce byla optimalizace difúzních experimentů přes rostlinné kutikuly, které tvoří vnější ochrannou bariéru listů rostlin. Za účelem studia transportu byly využity Stokesovy horizontální difúzní cely a jako zástupce rostlinných kutikul byly vybrány kutikuly bobkovišně lékařské, které byly pro difúzní experimenty využívány již dříve na Fakultě chemické, VUT v Brně a nově byly pro srovnání použity také kutikuly rajčete jedlého. Jako difúzní médium byl vybrán roztok lignohumátu draselného, jehož transport byl měřen v difúzní cele pomocí metody UV-VIS. Kalibračním roztokem pro transportní experimenty byl chlorid draselný, který byl v difúzní cele stanovován pomocí konduktometrie.

Výslednými difúzními parametry charakterizujícími transportní experimenty byly difúzní koeficienty a časy průchodů LH přes kutikuly. Pilotní pokusy tvořil transport LH o koncentracích 5 hm. % a 10 hm. % přes list bobkovišně, tyto experimenty se však nezdařily, jelikož v přijímací komoře difúzní cely nebyla zaznamenána žádná odezva. Byl proto vytvořen model 5 vrstev izolovaných kutikul, přes které LH penetroval. K výpočtům difúzních koeficientů byl použit matematický model Stokese [66], jehož poznatky byly využity také v publikaci [52]. Hodnoty stanovených difúzních koeficientů pak byly diskutovány v závislosti na zjištěných vlastnostech kutikul. Kromě difúzního koeficientu lignohumátu draselného byl také zjišťován difúzní koeficient chloridu draselného a jejich hodnoty byly porovnávány s příloženými referencemi.

Kutikuly bobkovišně byly izolovány pomocí enzymatické a chemické metody izolace a kutikula rajčete byla kromě zmíněných izolací separována také mechanicky. Pomocí použitých analytických metod optické a rastrovací elektronové mikroskopie a profilometrie byly zkoumány vlastnosti kutikul, které byly porovnávány. Nejvýznamnějším faktorem, který ovlivnil transportní procesy, byla přítomnost stomat na spodní kutikule bobkovišně. Spodní kutikuly byly zároveň křehčí a snadno docházelo k jejich poškození při neopatrné manipulaci. Z hlediska metod izolace bylo pomocí měřicí metody profilometrie zjištěno, že kutikuly bobkovišně izolované chemickou metodou byly tenčí a jejich povrch byl více homogenní na rozdíl od silnějších enzymaticky izolovaných kutikul.

Stanovením difúzních koeficientů KCl i LH bylo potvrzeno, že rychlost difúze souvisí s tloušťkou membrány, kdy přes CHI kutikuly penetroval roztok KCl i LH rychleji než přes silnější EI kutikuly bobkovišně. Trend stanovených difúzních koeficientů pro CHI a EI kutikuly bobkovišně odpovídal naměřeným výsledkům v práci M. Laštůvkové [65].

Kutikuly rajčat se svou strukturou podobaly horním kutikulám bobkovišně, proto byly zvoleny jako vhodný srovnávací materiál pro diskuzi transportu LH skrze kutikuly rajčete. Transportní experimenty přes kutikuly rajčat však neprobíhaly rychleji než přes CHI kutikuly bobkovišně, což značí jisté strukturální rozdíly a rozdíl ve vlivu izolační směsi při izolaci kutikul. Dužnina plodů rajčat je měkčí, než mezofyl listů bobkovišně, a je enzymy rozkládána snadněji. Určené difúzní koeficienty LH pro kutikuly rajčat byly přibližně o dva číselné řády nižší. Z tohoto důvodu bylo vyvozeno, že LH prostupuje kutikulami rajčat méně, než kutikulami bobkovišně.

Uvedené difúzní experimenty sloužily pro optimalizaci metody transportu skrze rostlinné kutikuly za využití Stokesových cel, čehož bylo v rámci této diplomové práce dosaženo. Pilotní experimenty pro transport LH přes kutikuly bobkovišně a rajčete vykazovaly velkou časovou náročnost, proto musí být z hlediska statistického vyhodnocení ještě několikrát zopakovány, aby byly výsledky naprosto relevantní.

Významnou součástí této diplomové práce je také charakterizace lignohumátu draselného, který byl využíván jako difúzní médium. Jako zástupce huminových látek vykazuje pozitivní vliv na pěstování plodin ať už z hlediska kvality či výnosu a je vhodný mimo jiné také pro aplikaci ve formě postřiku. Na začátek byly provedeny jednoduché základní charakterizace stanovením hodnot pH a elektrické vodivosti. Dále byla využita metoda tenziometrie, která potvrzuje jeho povrchově aktivní vlastnosti. Druhou analytickou metodou byla termogravimetrická analýza, kterou bylo zjištěno, že přípravek obsahuje 6 % vlhkosti a 40 % popela. Metodou velikostně vylučovací chromatografie s detekcí UV a diferenčním refraktometrem bylo zjištěno, že použitý Lignohumát A tvoří ve vodě koloidní roztok a molekuly mohou prostupovat rostlinnými membránami včetně kutikul listů.

Předložená problematika má podpořit výzkum transportních mechanismů, které jsou součástí foliárního hnojení, neboli aplikace účinných látek na list za účelem zlepšení výnosu či kvality zemědělských plodin. Optimalizovaná metoda transportu lignohumátu pak může být využita také pro jiný typ zemědělských produktů či kutikul izolovaných z plodin např. okurky, cibule, kukuřice apod.

8 POUŽITÉ ZKRATKY

AI	aktivní ingredience
CMC	kritická micelární koncentrace
EI	enzymaticky izolované
EIK	enzymaticky izolovaná kutikula
EMI	enzymatická metoda izolace
FK	fulvinové kyseliny
HK	humínové kyseliny
HL	humínové látky
HU	huminy
CHMI	chemická metoda izolace
CHI	chemicky izolované
CHIK	chemicky izolovaná kutikula
IR	infračervená spektrometrie
LH	lignohumát
MI	mechanicky izolovaná
M_w	hmotnostně střední molární hmotnost
M_N	početně střední molární hmotnost
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAL	povrchově aktivní látka
PDI	Index polydisperzity
SEC-UV-dRI	velikostně vylučovací chromatografie s detekcí UV a diferenčním refraktometrem
SEM	rastrovací elektronový mikroskop
TGA	termogravimetrická analýza
UV-VIS	ultrafialová-viditelná spektrometrie

9 ZDROJE

- [1] WALLERIUS, J.G. *De Humo* (Diss. Upsala, Sweden) *Agriculturae fundamenta chemica spez.* (1761)
- [2] BURSÁKOVÁ, Petra. *Hydration of Humic Substances = hydratace huminových látek.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011, 98 l. : il.
- [3] SPRENGEL, K.: *Die Bodenkunde oder die Lehre vom Boden.* Müller, Leipzig 1839.
- [4] BERZELIUS J.J: *Lehrbuch der Chemie.* Wöhler, Dresden and Leipzig 1839.
- [5] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers.* Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 35-273-0230-1.
- [6] KOVÁŘ, J.: *Využití termoanalytických metod při studiu lignitických huminových látek.* Brno, 2003. 90 s. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc
- [7] RODRÍGUEZ, Francisco J. a Luis A. NÚÑEZ. Characterization of aquatic humic substances. *Water and Environment Journal* [online]. 2011, **25**(2), 163-170 [cit. 2019-04-30]. ISSN 17476585.
- [8] SKOKANOVÁ, Marianna a Katarína DERCOVÁ. Huminové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy* [online]. 2008, (102), 262-268 [cit. 2017-05-18].
- [9] PICCOLO, Alessandro. *The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science* [online]., 57 [cit. 2017-05-18]. DOI: 10.1016/S0065-2113(02)75003-7.
- [10] WAKSMAN, S. A. (1932) *Humus.* Baltimore: Williams & Wilkins.
- [11] STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions.* 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 0-471-59474-1
- [12] HAIDER, K., 1992. *Biochemical processes of formation and dynamics of humic substances in soil, soil utilization and soil fertility.* vol. 4. Humus budget. *Berichte ueber Landwirtschaft, Sonderheft No. 206*, pp. 45–62
- [13] SCHNITZER M., Khan S. U.: *Soil Organic Matter*, New York, Elsevier, 1978.
- [14] FASUROVA, Nadezda, Lubica POSPISILOVA. *Characterization of soil humic substances by ultraviolet-visible and synchronous fluorescence spectroscopy.*[online]. Lubica Pospisilova. Sveuciliste U Zagrebu: *Journal of Central European Agriculture*, 2010, 11(3), 351. ISSN 1332-9049.

- [15] LAŠTŮVKOVÁ, Marcela. *Návrh a optimalizace metody studia penetrace huminových kyselin do listů* [online]. Brno, 2012. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.
- [16] MONTONERI, Enzo, V. Boffa, P. Quagliotto, R. Mendichi, M. Chierotti, G. Roberto a C. Medana. *Humic acid-like matter isolated from green urban wastes. Part I: Structure and surfactant properties.* [online]. North Carolina State University, ©2008, **3**(1), 123-141. ISSN 1930-2126.
- [17] ŽÁČEK, Ladislav. *Hydrochemie: Organické látky ve vodách.* Vyd. 1. Brno: VUTUM, 1998. ISBN 80-214-1167-8
- [18] CLAPP C. E., Hayes M. H. B., Simpson A. J., Kingery W. L. In: *Chemical processes in soils.* (MA Tabatabai and DL Sparks Eds.); Soil Science Society of America 2005, SSSA Book Series, Medison, Wisconsin, USA, 8, 1-150.
- [19] ERTANI, Andrea, D. Pizzeghello, A. Baglieri, V. Cadili, F. Tambone, M. Gennari, S. Nardi a G. Zeng. Humic-like substances from agro-industrial residues affect growth and nitrogen assimilation in maize (*Zea mays* L.) plantlets: An effective washing agent for heavy metal (Cd, Ni) removal from contaminated sediments. *Journal of Geochemical Exploration* [online]. Elsevier, ©2013, 129, 103-111. ISSN 03756742. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0375674212002014>
- [20] GUETZLOFF, T. F. a James A. RICE. *Micellar Nature of Humic Colloids: Humic and Fulvic Acids* [online]. Washington, DC: American Chemical Society, ©1996. ISBN 0-8412-3468-X.
- [21] QUAGLIOTTO, Pierluigi, Enzo MONTONERI, Fulvia TAMBONE, Fabrizio ADANI, Roberto GOBETTO a Guido VISCARDI. *Chemicals from Wastes: Compost-Derived Humic Acid-like Matter as Surfactant* [online]. Torino: Dipartimento di Produzione Vegetale, ©2006, **40**(5), 1686-1692. ISSN 0013-936X.
- [22] BURSÁKOVÁ, P.: *Hydration of biomolecules.* Brno, 2009. 38 s. Pojednání k dizertační práci na Chemické fakultě Vysokého učení technického na Ústavu spotřební chemie. Vedoucí práce prof. PhD. Miloslav Pekař, CSc.
- [23] ERDOGAN, S., Baysal, A., Akba, O., and Hamamci, C., *Interaction of metals with humic acid isolated from oxidized coal, Pol. J. Environ. Stud.*, ©2007, vol. 16, no. 5, pp. 671-675
- [24] FUENTES, M., Olaetxea, M., Baigorri, R., et al., Mainbinding sites involved in Fe (III) and Cu (II) complexation in humic-based structures, *J. Geochem. Explor.*, ©2013, vol. 129, pp. 14–17

- [25] ZHEREBTSOV, S. I., N. V. Malysenko, L. V. Bryukhovetskaya, S. Yu. Lyrshchikov a Z. R. Ismagilov. Sorption of Cobalt Cations by Humic Acid: *Coke and Chemistry* [online]. ©2018, **61**(7), 266-269. ISSN 1068-364X.
- [26] Huminové látky. In: INCAN [online]. Incan nutrition s.r.o., 2012 [cit. 2019-03-02]. Dostupné z: <http://www.incan.cz/index.php/huminove-latky>.
- [27] KLÖCKING, R. a B. Helbig. *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications: Medical Aspects and Application of Humic Substances*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 3-527-31154-8.
- [28] Humic & Fulvic acids. *New AG International*. Listopad 2009, s. 28-37.
- [29] Lignohumát A. *AMAGRO Humic Substances* [online]. Praha: AG TOP TIP, 2008 [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: <https://www.amagro.com/lignohumat-a.html>
- [30] ČERNOHORSKÝ, Zdeněk. *Základy rostlinné morfologie: celost. Vysokoškolská učebnice*. Ilustrace Hana Strihavková. 6., upr. vyd., v SPN 4. vyd. Praha: SPN, 1967
- [31] MAUSETH, James D. *Plant Anatomy*. 2. Texas: The Blackburn Press, 2001. ISBN 9781932846171.
- [32] VOTRUBOVÁ, O. *Anatomie rostlin, skriptum*. Karolinum, Praha, 1996
- [33] FERNÁNDEZ, V., Khayet, M., Montero-Prado, P., Heredia-Guerrero, J. A., Liakopoulos, G., Karabourniotis, G., et al. New insights into the properties of pubescent surfaces: peach fruit as a model. *Plant Physiol*. ©2011, 156, 2098–2108. DOI: 10.1104/pp.111.176305
- [34] KIRKWOOD, Ralph C. Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides. *Pest Management Science* [online]. ©1999, **55**(1) [cit. 2018-05-04]. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9063(199901)55
- [35] GRACA, J., Schreiber, L., Rodrigues, J., and Pereira, H. Glycerol and glyceryl esters of omega-hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry*. ©2002, 61, 205–215. DOI: 10.1016/S0031-9422(02)00212-1
- [36] GUZMÁN-DELGADO, P., Fernández, V., Graca, J., Cabral, V., and Gil, L. The presence of cutan limits the interpretation of cuticular chemistry and structure: *Ficus elastica* leaf as an example. *Physiol. Plant*. ©2016. DOI: 10.1111/ppl.12414 [Epub ahead of print].
- [37] DESHMUKH, A. P., Simpson, A. J., Hadad, C. M., and Hatcher, P. G. Insights into the structure of cutin and cutan from *Agave americana* leaf cuticle using HRMAS NMR spectroscopy. *Organ. Geochem*. ©2005, 36, 1072–1085. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2005.02.005

- [38] JETTER, R., Kunst, L., and Samuels, A. L. Composition of plant cuticular waxes. *Biology of the Plant Cuticle, Annual Plant Reviews*, ©2006 Vol. 23, eds M. Riederer and C. Müller (Oxford: Blackwell Publishing), 145–181.
- [39] España, L., Heredia-Guerrero, J. A., Segado, P., Benítez, J. J., Heredia, A., and Domínguez, E. Biomechanical properties of the tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit cuticle during development are modulated by changes in the relative amounts of its components. *New Phytol.* ©2014 202, 790–802. DOI: 10.1111/nph.12727
- [40] DOMÍNGUEZ, E., Heredia-Guerrero, J. A., and Heredia, A. The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol.* ©2011, 189, 938–949. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03553.x
- [41] ANTONIOU KOUROUNIOTI, R. L., L. R. Band, J. A. Fozard, et al. Buckling as an origin of ordered cuticular patterns in flower petals. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. ©2012, **10**(80), 20120847-20120847. ISSN 1742-5689
- [42] *Air Pollutants and the Leaf Cuticle* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, ©1994. ISBN 978-3-642-79083-6.
- [43] TREDENICK, Eloise C., Troy W. FARRELL, W. Alison FORSTER a Steven T. P. PSALTIS. Nonlinear Porous Diffusion Modeling of Hydrophilic Ionic Agrochemicals in Astomatous Plant Cuticle Aqueous Pores: A Mechanistic Approach. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2017, **2017**(8), ISSN 1664-462X.
- [44] RAMPÁČKOVÁ, Eliška. Využití fyzikálně-chemických metod pro studium interakce huminových látek s rostlinnými kutikulami. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2017
- [45] JETTER, R., S. Schaffer a M. Riederer. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant, Cell and Environment* [online]. 2000, **23**(6), 619-628. ISSN 0140-7791.
- [46] JETTER, R. Chemical Composition of the *Prunus laurocerasus* Leaf Surface. Dynamic Changes of the Epicuticular Wax Film during Leaf Development. *PLANT PHYSIOLOGY* [online]. **126**(4), 1725-1737. ISSN 00320889.
- [47] VALESKA ZEISLER-DIEHL Viktoria, Britta Migdal a Lukas Schreiber. Quantitative characterization of cuticular barrier properties: methods, requirements, and problems. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2017, **68**(19), 5281-5291. ISSN 0022-0957.
- [48] LUQUE, P., S. Bruque a A. Heredia. Water Permeability of Isolated Cuticular Membranes: A Structural Analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. ©1995, **317**(2), 417-422. ISSN 00039861.

- [49] HSU, KENNETH H. A Diffusion Model with a Concentration-Dependent Diffusion Coefficient for Describing Water Movement in Legumes During Soaking. *Journal of Food Science* [online]. 1983, **48**(2), 618-622. ISSN 0022-1147.
- [50] SATCHIVI, Norbert M., Edward W. STOLLER, Loyd M. WAX a Donald P. BRISKIN. A Nonlinear Dynamic Simulation Model for Xenobiotic Transport and Whole Plant Allocation Following Foliar Application. III. Influence of Chemical Properties, Plant Characteristics, and Environmental Parameters on Xenobiotic Absorption and Translocation. *Pesticide Biochemistry and Physiology* [online]. 2001, **71**(2), 77-87. ISSN 00483575.
- [51] PECHA, Jiří, Tomáš FÜRST, Karel KOLOMAZNÍK, Veronika FRIEBROVÁ a Petr SVOBODA. Protein biostimulant foliar uptake modeling: The impact of climatic conditions. *AIChE Journal* [online]. 2012, **58**(7), 2010-2019. ISSN 00011541.
- [52] SMILEK, Jiří. *Nové metody studia reaktivity a transportních vlastností biokoloidů* [online]. Brno, 2016. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martina Klučáková.
- [53] HIEMENZ, P. *Principles of colloid and surface chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc., ©1997. ISBN 08-247-9397-8.
- [54] FICK, Adolph. *On liquid diffusion*. *Journal of Membrane Science*. 1995, vol. 100, no. 1, pp. 33-38. ISSN 0376-7388.
- [55] NOVÁK, Josef P, Lidmila BARTOVSKÁ, Michal BUREŠ, Pavel CHUCHVALEC, Stanislav LABÍK, Anatol MALIJEVSKÝ, Jaroslav MATOUŠ a Ivan SAMHÝL. *Fyzikální chemie II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 319 s. ISBN 80-7080-436-X.
- [56] MASARO, Laurent a Xiaoxia ZHU. *Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids*. *Progress in Polymer Science*. 1999, vol. 24, no. 5, pp. 731-775. ISSN 0079-6700.
- [57] SEDLÁČEK, Petr, Jiří SMILEK a Martina KLUČÁKOVÁ. How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – results from diffusion cells. *Reactive and Functional Polymers*. 2013, vol. 73, no. 11, pp. 1500-1509. ISSN 1381- 5148.
- [58] FORSTER, W Alison, Jerzy A ZABKIEWICZ, Markus RIEDERER, Veronika FRIEBROVÁ a Petr SVOBODA. Mechanisms of cuticular uptake of xenobiotics into living plants: 1. Influence of xenobiotic dose on the uptake of three model compounds applied in the absence and presence of surfactants into *Chenopodium album*, *Hedera helix* and *Stephanotis floribunda* leaves. *Pest Management Science* [online]. 2004, **60**(11), 1105-1113. ISSN 1526-498X.

- [59] SCHONHERR, J. a M. J. BUKOVAC. Penetration of Stomata by Liquids: Dependence on Surface Tension, Wettability, and Stomatal Morphology. *PLANT PHYSIOLOGY* [online]. 1972, **49**(5), 813-819. ISSN 0032-0889.
- [60] YAMADA, Y., S. H. WITTER a M. J. BUKOVAC. Penetration of Ions through Isolated Cuticles. *PLANT PHYSIOLOGY* [online]. 1964, **39**(1), 28-32. ISSN 0032-0889.
- [61] KRAEMER, Thorsten, Mauricio HUNSCHE a Georg NOGA. Cuticular calcium penetration is directly related to the area covered by calcium within droplet spread area. *Scientia Horticulturae* [online]. 2009, **120**(2), 201-206. ISSN 03044238.
- [62] TYREE, M. T., T. D. SCHERBATSKOY a C. A. TABOR. Leaf Cuticles Behave as Asymmetric Membranes: Evidence from the Measurement of Diffusion Potentials. *PLANT PHYSIOLOGY* [online]. 1990, **92**(1), 103-109. ISSN 0032-0889.
- [63] TREHERNE, J.E. The diffusion of non-electrolytes through the isolated cuticle of *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*[online]. 1957, **1**(2), 178-186. ISSN 00221910.
- [64] TYREE, M. T., C. R. WESCOTT, C. A. TABOR a A. D. MORSE. Diffusion and Electric Mobility of KCl within Isolated Cuticles of *Citrus aurantium*. *PLANT PHYSIOLOGY* [online]. 1992, **99**(3), 1057-1061 [cit. 2019-05-05]. ISSN 0032-0889.
- [65] LAŠŤŮVKOVÁ, M. *Studium transportu huminových látek skrz rostlinné kutikuly*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 94 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [66] STOKES, William. Integral diffusion of potassium chloride solutions for calibration of diaphragm cells. *Journal of American Chemical Society*. 1951, vol. 73, no. 7, pp. 3527-3528. ISSN 0002-7863.