FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED UNIVERZITY MATEJA BELA

UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE
FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED A INFORMATIKY

FPV UMB V BANSKEJ BYSTRICI
FPV UCM V TRNAVE
FPVaI UKF V NITRE

ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA 2024

ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

Študentská vedecká konferencia 2024

Fakulta prírodných vied a informatiky Univerzity Konštantína Filozofa v Nitre

Fakulta prírodných vied Univerzity Mateja Bela v Banskej Bystrici

Fakulta prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave

Zborník recenzovaných príspevkov

Dátum konania: 17. apríl 2024

Editorky: doc. RNDr. Ingrid Turisová, PhD.
Ing. Slavka Račáková, PhD.

Vydavateľ: Fakulta prírodných vied, Univerzita Mateja Bela v Banskej Bystrici
Fakulta prírodných vied a informatiky, Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre
Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

Vydanie: prvé

Rozsah strán: 482

Rukopisy neprešli jazykovou korektúrou. Za jazykovú úpravu príspevkov zodpovedajú autori.

ŠVK 2024 a vydanie zborníka recenzovaných príspevkov bolo podporené grantom KEGA 009UCM-4/2024 „Inovácia vzdelávacieho procesu na bakalárskom a magisterskom študijnom programe biomedicínska chémia“; KEGA 034UKF-4/2022 „Biomedicínske a bioinformatické databázy v biologických študijných programoch s aplikáciou do praxe“ a KEGA 012UKF-4/2023 „Implementácia inovácií do edukačného procesu predmetov všeobecná a špeciálna histológia živočíchov s orientáciou na prax“.

ISBN 978-80-557-2147-7
EAN 9788055721477

https://doi.org/10.24040/2024.9788055721477

Táto publikácia je šírená pod licenciou Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International Licence CC BY-NC (uvedenie autora – nekomerčné použitie)

Vedeckí garanti
doc. RNDr. Ingrid Turisová, PhD.
prof. RNDr. Radoslav Omelka, PhD.
Mgr. Dominika Vešelényiová, PhD.

Organizačný výbor konferencie na FPV UCM v Trnave
Mgr. Dominika Vešelényiová, PhD.
doc. Ing. Jozef Sokol, CSc.
doc. Mgr. Daniel Mihálik, PhD.
Mgr. Martin Valica, PhD.
Ing. Eva Ürgeová, PhD.
Ing. Jana Jurinová, PhD.

Organizačný výbor konferencie na FPVaI UKF v Nitre
prof. RNDr. Radoslav Omelka, PhD.
PaedDr. Katarína Zverková
RNDr. Gabriela Repaská, PhD.
Ing. Michal Levický, PhD.
Mgr. Mária Pappová
Mgr. Matúš Valko
Mgr. Veronika Kubová
Mgr. Barbora Loncová
Mgr. Silvia Haringová
Mgr. Tibor Kovács
Mgr. Marcel Cvik
Mgr. Silvia Čajková

Organizačný výbor konferencie na FPV UMB v Banskej Bystrici
doc. RNDr. Ingrid Turisová, PhD.
Ing. Slavka Račáková, PhD.
doc. RNDr. Zuzana Melichová, PhD.
doc. Ing. Ján Tomaškin, PhD.
doc. PaedDr. Ján Stebila, PhD.
RNDr. Miroslav Melicherčík, PhD.
prof. RNDr. Vladimír Janiš, CSc.
doc. Ing. Juraj Švajda, PhD.
prof. Dr. Boris Tomášik
Mgr. Lenka Balážovičová, PhD.

Recenzenti
RNDr. Miroslav Melicherčík, PhD.
prof. RNDr. Vladimír Janiš, CSc.
doc. Ing. Juraj Švajda, PhD.
Mgr. Lenka Balážovičová, PhD.
Mgr. Marcel Cvik
doc. RNDr. Martin Morovič, PhD.
prof. RNDr. Juraj Hreško, CSc.
prof. RNDr. Radoslav Omelka, PhD.
doc. PaedDr. Stanislav David, PhD.
doc. RNDr. Alfred Krogmann, PhD.
prof. RNDr. Mária Vondráková, CSc.
prof. RNDr. Monika Martiniaková, PhD.
doc. Ing. Melánia Feszterová, PhD.
doc. Ing. Igor Štubňa, CSc.
doc. RNDr. Beáta Piršelová, PhD.
Mgr. Janka Pecuchová, PhD.
RNDr. Gabriela Repaská, PhD.
doc. RNDr. Peter Boleček, PhD.
Mgr. Dominika Martinčeková
Mgr. Martin Cápay, PhD.
RNDr. Veronika Kováčová, PhD.
PaedDr. Lukáš Wittlinger
RNDr. Michal Benc, PhD.
prof. RNDr. Dáša Munková, PhD.
Mgr. Ján Francisti, PhD.
prof. RNDr. Anna Tirpáková, CSc.
Ing. Eva Ürgeová, PhD.
RNDr. Zuzana Gerši, PhD.
RNDr. Vanda Adamcová, PhD
doc. Ing. Jana Moravčíková, PhD.
prof. RNDr. Miroslav Ondrejovič, PhD.
doc. RNDr. Ľubica Uváčková, PhD.
doc. RNDr. PaedDr. Ladislav Huraj, PhD.
doc. RNDr. Cyril Rajnák, PhD. et PhD.
doc. Ing. Tibor Maliar, PhD.
Mgr. Marián Hosťovecký, PhD.
Ing. Darja Gabriška, PhD.
Ing. Marek Šimon, PhD.
prof. RNDr. Juraj Krajčovič, CSc.
doc. Mgr. Renáta Gašparová, PhD.
RNDr. Vanda Adamcová
Ing. Katarína Pribilová, PhD.
prof. RNDr. Jiří Pospíchal, DrSc.
RNDr. Šarlota Kaňuková, PhD.
Ing. Miroslav Beňo, PhD.
Mgr. Dominika Vešelényiová, PhD.
doc. RNDr. Daniela Ondrejovič Chmelová
doc. RNDr. Vladimír Frišták, PhD.
RNDr. Beáta Vranovičová, PhD.
prof. RNDr. Ján Titiš, PhD.
doc. Ing. Michal Čerňanský, PhD.
doc. RNDr. Miroslav Horník, PhD.

Obsah

PREDSLOV **9**

BIOLÓGIA, EKOLÓGIA A ENVIRONMENTALISTIKA **10**

Morfologická a cytotypová variabilita v skupinách druhov *Erysimum odoratum* a *E. virgatum* (Brassicaceae)
Richard Bačák 11

Monitoring prítomnosti patogénov na povrchu osiva vybraných druhov zeleniny z čeľade *Brassicaceae*
Kamila Bariová 19

Štruktúra a diverzita spoločenstiev pakomárov (*Chironomidae*) mestských pondov
Silvia Bartóková 25

Anatomické a fyziologické aspekty v odpovedi rastlín slnečnice na abiotický stres
Viktória Borguľová 33

Antimikrobiálne vlastnosti nanočastíc striebra pripravených zelenou syntézou
Dominika Gunárová 41

LAMP detekcia patogénov *Xanthomonas euvesicatoria* a *Xanthomonas gardneri* z osiva vybraných kultivarov kapusty
Romana Chovaniaková 47

Príprava domácich parených kysnutých knedieľ s vyšším obsahom β-D-glukánov
Daniel Jánoška 51

Porovnanie metód spracovania krvi plazov na laboratórne vyšetrenie
Veronika Komárňanská, Janka Schlarmannová, Róbert Kirchner 59

Sledovanie vplyvu NiCl2 na fotosyntetické pigmenty, prolín a celkový proteóm *Euglena gracilis*Lucia Kotradyová, Jana Moravčíková, Maksym Danchenko 66

Porovnanie reprodukčných parametrov tetraploidného a pentaploidného cytotypu *Solidago gigantea* v nepôvodnom areáli
Michaela Murgašová, Katarína Skokanová, Barbora Šingliarová 73

Vplyv zloženia média na produkciu polyhydroxybutyrátu baktériou Cupriavidus necator
Soňa Ronďošová, Daniela Chmelová, Miroslav Ondrejovič 82

BIOTECHNOLÓGIE **87**

Produkcia polyhydroxybutyrátu pomocou halofilnej baktérie *Halomonas halophila*
Zuzana Baťová, Daniela Chmelová, Miroslav Ondrejovič 88

Využitie systému CRISPR-Cas9 pre štúdium funkcie vybraných génov u *Euglena gracilis*
Terézia Blažeková, Vanessa Gelanová, Andrej Jedlička 94

Vplyv vybraných suplementov FLI média (FGF2, LIF, IGF1) na *in vitro* maturáciu oocytov
Patrik Fecko 98

Vplyv vitamínu D3 na viabilitu primárnej bunkovej kultúry osteoblastov u potkanov
Monika Fulková 103

Příprava a charakterizace želé cukrovinek s přídavkem extraktu brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus*)
Pavlína Knapovská 108

Zvýšenie obsahu kmeňových buniek v kalusovom pletive z nechtíka lekárskeho (*Calendula officinalis L.*)
Klaudia Lenkavská, Šarlota Kaňuková, Marcela Gubišová, Ján Kraic 114

Produkcia biomasy kalusu z durmanu obyčajného (*Datura stramonium L.*)
Sofia Mikulášková, Šarlota Kaňuková, Ján Kraic 119

Sledovanie zmien celkového proteómu, fotosyntetických pigmentov a prolínu pri kultivácii *Euglena gracilis* v tme
Adriana Paprčková, Jana Moravčíková, Maksym Danchenko 124

Indukcia kalusových kultúr z koreňových segmentov durmanu obyčajného (*Datura stramonium L.*)
Jennifer Scherrens, Šarlota Kaňuková, Ján Kraic 130

Vplyv umelej infekcie ovsa siateho druhmi rodu Fusarium na obsah β-D-glukánu v zrnách
Žofia Škvareková, Michaela Havrlentová, Martina Hudcovicová, Lenka Klčová, Katarína Ondreičková, Svetlana Šliková 134

Príprava nanočastíc striebra zelenou syntézou
Simona Tkáčiková 140

GEOGRAFIA, ODBOROVÁ DIDAKTIKA 146

Využitie historického cintorína vo vyučovaní biológie
Samuel Bednár, Marcela Adamcová, Lucia Smutná, Bianka Žatková 147

Špecifiká migrácie zo severnej Afriky do Európskej únie
Boris Brath 155

Znečistenie ovzdušia látkami PM10 počas Silvestra v roku 2023 na území Slovenska
Jakub Cimbala 163

Zaujímavé úlohy z biológie človeka pre žiakov základných škôl
Janka Cvachová 171

Tvorba úloh podporujúcich kritické myslenie pre žiakov gymnázia na tému Pohybová sústava človeka
Artem Kravchenko 179

Monitoring vodných tokov na príklade Tajovského potoka a Bystrice
Lucia Mojžitová 185

Sprievodca obcou Uhrovec
Ľuboš Sokol 193

Hodnotenie cykloturistickej siete v regióne Turiec
Tomáš Šuvada 200

CHÉMIA, FYZIKA, MATEMATIKA 208

Implikátory na konečných reťazcoch
Saskia Balážová 209

Príprava a charakterizácia inovatívneho sorbentu AsO43- iónov na báze Mg-modifikovaného biouhlia
Kristína Beliančínová, Gerhard Soja 214

Vývoj a syntéza nových typov fotosenzibilátorov s medicínskym aplikačným potenciálom
Dominika Kendrová 221

Hexakoordinované Co(II) komplexy obsahujúce Schiffove bázy
Jerguš Rosík 228

Syntéza a charakterizácia štvorjadrových Cu(II) μ4-oxido klastrov s N-donorovými ligandmi
Ráchel Rusová 233

Selektívnosť koordinačného polyédra Fe(III) komplexov pomocou Schiffovej zásady
Vanessa Šušuková 238

INFORMATIKA 243

Hodnotenie techník na odhaľovanie zmanipulovaných fotografií
Ivan Brlej 244

Aplikácia pre podporu prístupnosti v hre na klavír s využitím rozšírenej reality
Peter Hafner 251

Skúmanie stratégii indexovania pre efektívny prístup k dátam v databázovom systéme
Patrik Holeš 259

Power Automate použitie v kancelárii
Sofiia Holub 264

Analýza bezpečnosti SO-HO smerovačov v sieti IPv6
Dominik Hrinkino 270

Interakcia s počítačom sledovaním pohybu oka pomocou webkamery
Mário Chrušč 277

Výpočet orientácie známeho predmetu z 3D obrazu
Erik Kulka 281

Manažment elektrickej energie pomocou fotovoltických systémov
Pavol Lukačka 285

Rozhodovanie riadenia procesov NPC prostredníctvom umelej inteligencie v nástroji GOAP
Adam Mečíř 294

Softvérový systém pre správu voľných parkovacích miest
Martin Schmidt 300

Chatboty a Power Virtual Agents na univerzitách
Dana Stepanenko 306

Porovnanie algoritmov generujúcich dokonalé bludiská pre potreby 3D mobilnej videohry
Juraj Uhrina 313

Implementácia mobilného robota v prostredí ROS
Filip Vojník 320

PhD I. 324

Súčasné princípy biofortifikácie pšenice zinkom
Alexandra Hlavatá, Richard Hančinský 325

In silico* a *in vitro* štúdia sexuálneho potenciálu asexuálnej *Euglena gracilis
Andrej Jedlička, Dominika Vešelényiová, Vanessa Gelanová 330

Stanovenie intracelulárne akumulovaného polyhydroxyalkanoátu v baktériách druhu *Cupriavidus necator* s využitím Sudan Black B
Ľubomíra Jurečková, Daniela Chmelová 339

Molekulárna charakterizácia dvoch slovenských izolátov vírusu viniča A (rod *Vitivirus*)
Jana Kemenczeiová, Peter Alaxin, Lukáš Predajňa, Miroslav Glasa 347

Štúdium rozdielov v orálnom mikrobióme medzi nefajčiarmi a fajčiarmi v slovenskej populácii
Renáta Kozáčiková, Dominika Vešelényiová 352

Vplyv maturačného média na vývinový potenciál oocytov a kvalitu embryí produkovaných *in vitro*
Dominika Martinčeková, Alexandra Rosenbaum Bartková 357

Biopesticídne zlúčeniny rodu Tagetes a ich produkcia v *in vitro* kultivačných systémoch
Patrik Mihala, Ján Kraic 363

Flax tolerance to heavy metal ions and its use in phytoremediation programmes
Mária Pavlovičová 368

Účinky rakytníka rešetliakového a metformínu na biochemické a štrukturálne parametre diabetickej kosti
Noémi Pénzes, Roman Bíro, Veronika Kováčová 374

***In silico* štúdia unikátnych sekvenčno-štruktúrnych čŕt α-amylázovej rodiny GH126**
Michaela Schorschová 380

Magnetické pole ako dočasný environmentálny stresor
Miroslava Sinčák, Miroslav Šmelko, Pavol Lipovský, Milan Oravec, Miloslav Lupták, Petr Jandačka, Alena Luptáková, Jana Sedlaková-Kaduková 385

Variable cadmium content in cellular compartments of wheat tissues
Laura Žideková, Martina Gregorová 391

PhD II. 396

Povodňové riziká v priemyselných areáloch situovaných v blízkosti riek v Nitrianskom samosprávnom kraji
Adam Čaplák 397

Štruktúrna a spektrálna charakterizácia komplexov Cu(II) obsahujúcich bioaktívny N-donorový ligand
Michaela Červeňáková 403

Návrh aktivít na rozvoj informatického a matematického myslenia v neformálnom vzdelávaní
Michal Fojtík 410

Stanovení těkavých látek ve víně – Nástrahy kvantitativní analýzy při využití mikroextrakce na tuhou fázi
Michal Gross 415

Invázne a expanzívne dreviny a ich vplyv na vegetáciu a pôdu (projekt IMPAWOS): charakteristika vybraných druhov a lokalít
Lujza Kubáčková 420

Polymorfizmus BsmI *VDR* génu a hladiny lipidového profilu u jedincov s pľúcnou tuberkulózou
Karolína Kubalová 428

Vplyv zložitosti jazyka na čitateľnosť ekonomických textov
Mária Pappová 434

Vliv různých způsobů extrakce na antioxidační a antimikrobiální vlastnosti extraktu tužebníku jilmového
Matěj Rychetský 443

Pôvod a korekcia nulových hodnôt zaznamenaných senzorom GSR pri meraniach odporu kože
Matúš Šášik 450

Bzdochy (Heteroptera) v potrave mláďat a dospelcov včelárika zlatého (*Merops apiaster*) v Podunajsku
Eva Schlimbachová, Vladimír Hemala, Katarína Goffová 456

Citizen Science within Higher Secondary Education in order to increase Personal Engagement for Biodiversity Protection
Katarína Skokanová 461

Analýza správania rýchleho hádania v Priscille
Matúš Valko 470

Vplyv teploty a zloženia na tavenie sklokeramických glazúr
Marián Žilinec 477

Predslov

Do rúk sa Vám dostáva už v poradí ôsmy zborník recenzovaných príspevkov Študentskej vedeckej konferencie (ŠVK), ktorú spoluorganizuje Fakulta prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave (FPV UCM), Fakulta prírodných vied Univerzity Mateja Bela v Banskej Bystrici (FPV UMB) a Fakulta prírodných vied a informatiky Univerzity Konštantína Filozofa v Nitre (FPVaI UKF). Mnohé príspevky predstavujú prvé publikačné výstupy študentov zamerané na prezentáciu výsledkov ich vedeckej práce, v ktorých si zároveň ešte viac osvoja správnu odbornú terminológiu, štandardné členenie vedeckých článkov, spracovanie náplne jednotlivých kapitol, zjednotenie uvádzania rôznych typov bibliografických zdrojov, prácu s obrázkami, tabuľkami či inými ilustráciami. Prvýkrát sa viacerí študenti stretli aj so samotným recenzným konaním, ktoré štandardne predchádza publikovaniu vedeckého príspevku. No práve tento proces je neodmysliteľnou súčasťou vedeckej práce, ktorej sa budú v budúcnosti venovať. A pre nás, pedagógov, je študentská vedecká konferencia tiež jedným z nástrojov, ako študentov na túto cestu čo najlepšie pripraviť.

Dňa 17. apríla 2024 sa na pôde Fakulty prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave stretli na už v poradí 8. ročníku ŠVK (druhom spoločnom ročníku troch organizujúcich univerzít) študenti bakalárskych, magisterských a prvých ročníkov doktorandských študijných programov prírodovedných odborov nielen z radov organizátorov, ale aj z Trnavskej univerzity v Trnave, Prešovskej univerzity v Prešove a prvýkrát nadobudla konferencia aj medzinárodný rozmer vďaka zastúpeniu študentov z Vysokého učení technického v Brně. Spolu bolo prezentovaných 74 príspevkov, ktoré boli rozdelené podľa zamerania do 7 sekcií: Biológia, ekológia a environmentalistika; Geografia a odborová didaktika; Informatika; Chémia, fyzika, matematika; PhD I. (biológia); PhD II. a po prvýkrát boli v samostatnej sekcii Biotechnológie prezentované príspevky aj z tejto oblasti. V každej sekcii odborná komisia vybrala na ocenenie 3 najkvalitnejšie a najlepšie prezentované práce, pričom sa prihliadalo aj na odbornú úroveň riadenej diskusie. Spolu tak bolo ocenených 21 študentov.

Touto cestou by sme sa chceli poďakovať predovšetkým kolegom z FPV UCM za skvelú organizáciu konferencie a príjemnú atmosféru, v ktorej sa niesol celý deň, školiteľom, recenzentom, garantom sekcií, ako aj členom organizačného výboru za energiu a čas, ktorý venovali v prospech tohto podujatia. Všetkým študentom ďakujeme za aktívnu účasť, všetkým oceneným srdečne blahoželáme a tešíme sa na spoločné stretnutie na Fakulte prírodných vied a informatiky UKF v Nitre v roku 2025 pri ďalšom ročníku Študentskej vedeckej konferencie.

doc. RNDr. Ingrid Turisová, PhD.
prodekanka pre vedu a výskum, FPV UMB

prof. RNDr. Radoslav Omelka, PhD.
prodekan pre vedu a výskum, FPVaI UKF

Mgr. Dominika Vešelényiová, PhD.
prodekanka pre vedu a medzinárodné vzťahy, FPV UCM

FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED UNIVERZITY MATEJA BELA

UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE
PRÍRODNÝCH VIED A INFORMATIKY

Sekcia

Biológia, ekológia a environmentalistika

Morfologická a cytotypová variabilita v skupinách druhov *Erysimum odoratum* a *E. virgatum* (Brassicaceae)

Morphological and cytotype variation in the *Erysimum odoratum* and *E. virgatum* groups (Brassicaceae)

Richard Bačák[1]
Školiteľ: Judita Zozomová[2], Barbora Šingliarová[3]
[1]Katedra biológie, ekológie a životného prostredia, FPV UMB v Banskej Bystrici, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica
[2,3]Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV, v.v.i., Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava
[1]rbacak2@student.umb.sk, [2]judita.zozomova@savba.sk, [3]barbora.singliarova@savba.sk

Abstrakt

Erysimum je druhovo bohatý, taxonomicky aj evolučne zložitý rod s hojným výskytom polyploidov a endemitov. Naše štúdium sa venuje skupinám druhov *Erysimum odoratum* a *E. virgatum* rozšíreným v strednej Európe a na Balkáne. Cieľom bolo zistiť zastúpenie rôznych cytotypov na základe merania relatívneho obsahu DNA pomocou prietokovej cytometrie s následnou morfometrickou analýzou druhov a cytotypov zo skupiny *E. odoratum*. V skupine *E. odoratum* sme zistili vo väčšine rozlišovaných druhov prítomnosť rôznych cytotypov líšiacich sa obsahom DNA, v niektorých prípadoch aj s odlišným počtom chromozómov. V skupine *E. virgatum* sme potvrdili hexaploidnú úroveň, avšak zistili sme aj odlišnosti vo veľkosti genómu medzi niektorými druhmi. Morfometrickými analýzami sme zistili, že tetraploidné *E. odoratum* s.str. je relatívne dobre diferencované od diploidov, kým odlišnosti medzi rôznymi diploidnými druhmi a cytotypmi boli slabšie. Obe skupiny si zasluhujú detailnejšie štúdium aj s použitím molekulárnych a cytogenomických analýz.

Kľúčové slová: endemity, *Erysimum*, multivariačná morfometrika, polyploidia, prietoková cytometria

Abstract

Erysimum is a species-rich, taxonomically, and evolutionarily complex genus with a high occurrence of polyploids and endemics. Our study is focused on the *Erysimum odoratum* and *E. virgatum* species groups distributed in Central Europe and the Balkans. The goal was to determine their cytotype variation based on the measurements of relative DNA content by flow cytometry and subsequent morphometric analyses of species and cytotypes in the *E. odoratum* group. In the *E. odoratum* group, we found that most of the recognized species contain at least two cytotypes with different DNA content, in some cases also with different chromosome numbers. In the *E. virgatum* group, we confirmed the hexaploid level, but with differences in relative DNA content between some species. Morphometric analyses showed that the tetraploid cytotype of *E. odoratum* s.str. is relatively well differentiated from the diploids, while differences between diploid species and cytotypes are less significant. Both species groups deserve further studies, including molecular and cytogenomic analyses.

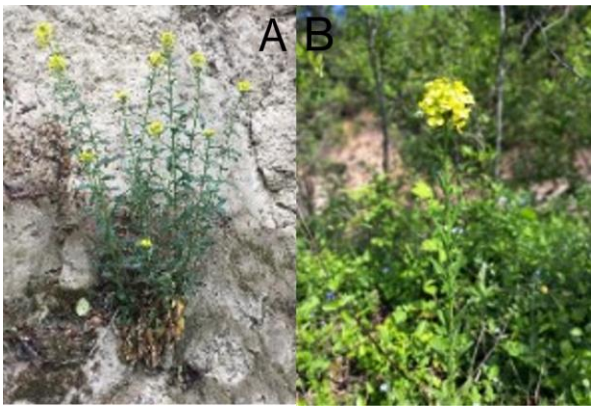
Key Words: endemics, *Erysimum*, flow cytometry, multivariate morphometrics, polyploidy

Úvod

Rod *Erysimum* L. (horčičník) je jedným z druhovo najbohatších rodov čeľade Brassicaceae (kapustovité), ktorý zahŕňa 150 až 350 druhov [1]. Na základe molekulárnych a biogeografických analýz môžeme predpokladať, že rod *Erysimum* sa začal diverzifikovať v období neskorého pliocénu až pleistocénu pred 5,2 až 2,33 miliónmi rokov v oblasti juhozápadnej Ázie a/alebo Stredomoria, odkiaľ sa rozšíril do zvyšku Európy a Ázie a následne cez Beringov prieliv, ktorý bol počas glaciálnych dôb súšou, do Severnej Ameriky [1, 2].

Z taxonomického a evolučného hľadiska sa jedná o jeden z najkomplikovanejších rodov čeľade. Táto komplikovanosť vyplýva z mnohých faktorov ako sú výskyt polyploidie, vysokej karyologickej variability, ako aj rýchlej a nedávnej speciácie vrátane tej kryptickej [2, 3, 4, 5]. V poslednej dobe boli viaceré štúdie venované druhom z Pyrenejského polostrova, ktorých variabilita je výrazne ovplyvnená hybridizáciou a introgresiou [5, 6, 7]. Druhy strednej Európy sú zatiaľ málo preskúmané [3]. Doposiaľ nebola publikovaná ucelená monografia rodu, ale rakúsky botanik A. Polatschek publikoval

viaceré práce s geografickým ohraničením [8, 9, 10]. Pravdepodobne príbuzné druhy sa zoskupujú do neformálnych taxonomických skupín ako sú aj nami študované skupiny *Erysimum odoratum* a *E. virgatum* s centrom rozšírenia v strednej Európe a na Balkáne. Je však na mieste poznamenať, že druhové zloženie týchto skupín sa v rôznych literárnych zdrojoch a databázach líši [9, 11, 12, 13]. Skupina *E. virgatum* pozostáva zo šiestich polyploidných druhov – *Erysimum virgatum* Roth*, E. hieracifolium* L. (obr. 1A)*, E. wahlenbergii* (Asch. & Engl.) Simonk.*, E. marschallianum* Andrz. ex M. Bieb.*, E. hungaricum* Zapał. a *E. pieninicum* (Zapał.) Pawł. Skupina *E. odoratum*, zahŕňajúca diploidy aj polyploidy, sa skladá z nasledovných deviatich druhov – *Erysimum odoratum* Ehrh. (obr. 1B)*, E. witmannii* Zaw.*, E. carniolicum* Dolliner*, E. croaticum* Polatschek*, E. vitekii* Polatschek*, E. pallidiflorum* Szepl. ex Ják.*, E. transsilvanicum* Schur*, E. pectinatum* Bory & Chaub. a *E. kuemmerlei* Ják. [9, 11, 12].



Obr. 1A: *Erysimum hieracifolium* z populácie v Dolnom Rakúsku (Niederösterreich) neďaleko obce Hollenburg; 1B: *Erysimum odoratum* z populácie na Slovensku, v Považskom Inovci pri obci Modrová.

Cieľom našej štúdie bolo zistiť zastúpenie rôznych cytotypov v oboch študovaných skupinách a ich druhoch pomocou merania relatívneho obsahu DNA metódou prietokovej cytometrie. Následne s použitím multivariačnej morfometriky sme skúmali morfologické odlišnosti medzi karpatskými druhmi, cytotypmi a populáciami spadajúcimi do skupiny *Erysimum odoratum*.

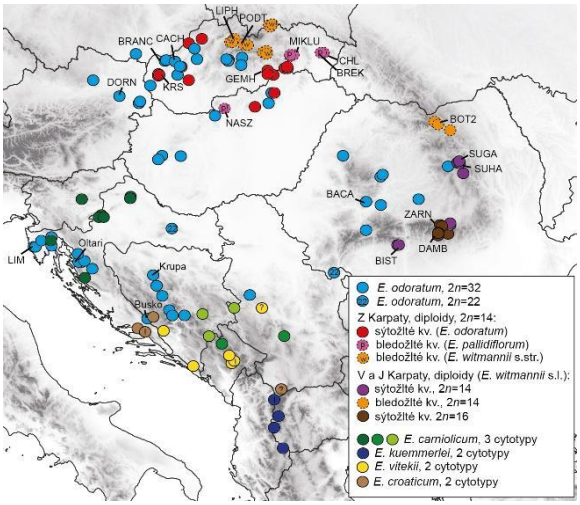
1 Materiál a metódy

V tejto kapitole sa budeme venovať zberu a spracovaniu rastlinného materiálu a súčasne sa pozrieme na analýzu obsahu relatívneho DNA prietokovou cytometriou.

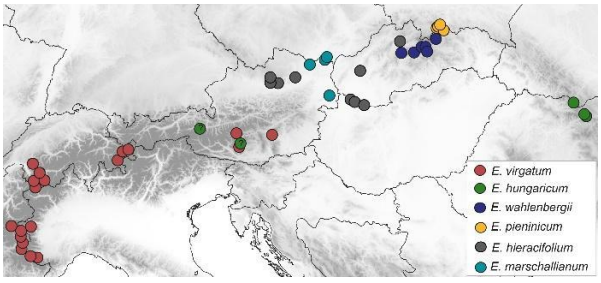
1.1 Zber a spracovanie rastlinného materiálu

Zber rastlinného materiálu druhov zo skupín *E. odoratum* a *E. virgatum* bol realizovaný v rokoch 2021 až 2023. Na zberoch sa podieľali zamestnanci Centra biológie rastlín a biodiverzity SAV, v.v.i spolu so zamestnancami Katedry biológie, ekológie a životného prostredia Fakulty prírodných vied Univerzity Mateja Bela. Na zberoch participoval aj autor príspevku.

Na analýzu obsahu DNA metódou prietokovej cytometrie boli použité listy usušené silikagélom. Z vybraných populácii skupiny *E. odoratum* boli vyhotovené aj herbárové položky (zvyčajne v počte 20, ak to umožňovala veľkosť populácie), ktoré slúžili na morfometrické štúdium. Lokality zberu sú znázornené na obrázkoch 2 a 3.



Obr. 2: Lokality zberu druhov skupiny *Erysimum odoratum*, z ktorých bol materiál použitý na cytometrické merania. Morfometricky vyhodnocované populácie sú označené príslušným kódom.



Obr. 3: Lokality zberu druhov skupiny *Erysimum virgatum*, z ktorých bol materiál použitý na cytometrické merania.

1.2 Analýza relatívneho obsahu DNA prietokovou cytometriou

Prietoková cytometria (FCM – flow cytometry) predstavuje jednu z najúčinnejších a najpoužívanejších metód na stanovenie obsahu DNA v jadrách rastlinných buniek, ktorá umožňuje odhad ploidného stupňa, resp. cytotypu v meranej vzorke študovaného jedinca. Princíp spočíva vo fluorescenčnom farbení a detekcii optických parametrov častíc (jadier) unášaných prúdom kvapaliny, ktorý pretína lúč intenzívneho žiarenia [14, 15].

Pre úspešnú FCM analýzu je prvým krokom uvoľnenie jadier z buniek, ktoré sa dosiahne mechanickým narušením pletiva ostrím žiletky alebo skalpela vo vhodnom pufri, v našom prípade sme použili roztok monohydrátu kyseliny citrónovej a Tweenu 20 (tzv. Otto I pufor). Okrem analyzovaného jedinca vybraného druhu z rodu *Erysimum* sa súčasne spracovala aj vzorka referenčného interného štandardu so známym obsahom DNA. Ako štandard bol použitý rajčiak jedlý (*Solanum lycopersicum* L.) s obsahom 1,96 pg DNA v jadrách a v niektorých prípadoch, keď došlo k prekryvu hodnôt vzorky a štandardu, bol použitý ľuľok paprikovitý (*Solanum pseudocapsicum* L.) s obsahom 2,59 pg DNA v jadrách. Následne, po mechanickom uvoľnení jadier, bola táto suspenzia zbavená rastlinných zvyškov prefiltrovaním cez nylonový filter s veľkosťou ôk 42 µm. Na záver bola suspenzia jadier ofarbená fluorescenčným farbivom (DAPI – 4´,6-diamino-2-fenylindol) v Otto II pufri (dodekahydrát fosforečnanu disodného) a analyzovaná v prietokovom cytometri Partec CyFlow® s UV-LED zdrojom žiarenia [15, 16, 17].

1.3 Morfometrické analýzy

Na preskúmanie miery morfologickej variability a odlišností medzi rôznymi druhmi, cytotypmi či populáciami sú vhodné metódy multivariačnej morfometriky [18]. Multivariačná morfometrika zahŕňa široké spektrum analýz, ktoré sa zvyknú deliť na metódy tvoriace hypotézy a na metódy slúžiace na testovanie hypotéz [18, 19]. Z prvej skupiny spomínaných metód sme použili zhlukovacie analýzy a dve ordinačné analýzy, analýzu hlavných komponentov (PCA) a analýzu hlavných koordinát (PCoA). Z druhej skupiny metód sme použili kanonickú diskriminačnú analýzu (CDA) a klasifikačnú diskriminačnú analýzu.

Tieto metódy sme použili na štúdium skupiny *E. odoratum* najmä z územia Karpát. Pri výbere znakov vhodných na meranie sme zohľadňovali znaky používané na determináciu taxónov v dostupnej literatúre [9, 20, 21]. Celkovo sme merali alebo zaznamenávali 32 znakov. Deväť z nich bolo meraných na kvetných častiach s použitím softvéru ImageJ v.1.53e [22]. Ďalej bolo meraných 17 morfologických znakov na listoch, 4 znaky na stonke a 2 znaky na trichómoch listov. Okrem pôvodných meraní sme z týchto znakov odvodili aj niekoľko pomerov. Nakoľko na mnohých herbárových položkách neboli zachované listy v dolnej časti stonky, vytvorili sme dve východzie matice dát. V matici 1 boli ponechané všetky merané jedince, ale vynechané boli znaky týkajúce sa dolných stonkových listov. V matici 2 boli ponechané všetky merané znaky, ale vynechané boli jedince, na ktorých chýbali dolné listy. Po vylúčení vysokokorelovaných znakov (pomocou Spearmanovho koeficientu) matica 1 zahŕňala 26 znakov a 398 jedincov, kým matica 2 obsahovala 34 znakov a 338 jedincov.

Na morfometrické analýzy bol použitý počítačový softvér R a balík MorphoTools2 [23].

2 Výsledky a diskusia

V tejto kapitole si rozoberieme dosiahnuté výsledky.

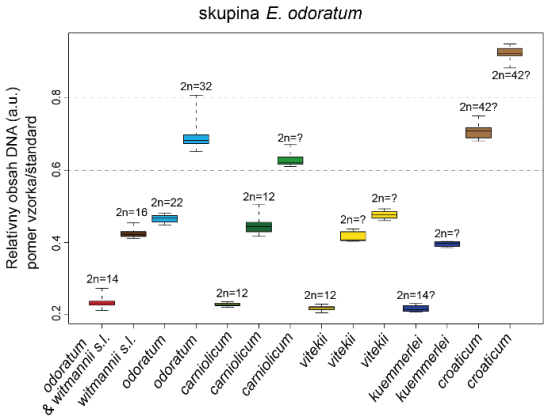
2.1 Analýza relatívneho obsahu DNA prietokovou cytometriou

Hodnoty relatívneho obsahu DNA namerané prietokovou cytometriou (vyjadrené pomerom fluorescencie jadier vzorky ku štandardu) ukázali v rámci študovaných druhov značnú variabilitu. Čiastočne sa naše výsledky zhodovali s doposiaľ publikovanými počtami chromozómov a ploidnými stupňami, ale taktiež sme odhalili doposiaľ neznáme cytotypy.

V skupine *E. odoratum* sme merali relatívny obsah DNA v 131 populáciách a 612 jedincoch. Pre druh *E. odoratum* sa doposiaľ udávali dva cytotypy a to diploidy s 2n = 14 a tetraploidy s 2n = 32 [23]. Už pri prvom pohľade je zjavné, že sa nejedná o jednoduchú duplikáciu genómu, nakoľko tetraploid nemá presne dvojnásobný počet chromozómov v porovnaní s diploidom. Naše merania potvrdili existenciu oboch cytotypov, pričom tetraploidy mali až trojnásobný obsah DNA voči diploidom. Okrem toho sme z dvoch lokalít zistili obsah DNA, ktorého veľkosť bola približne v strede medzi diploidmi a tetraploidmi (obr. 4). Karyologické analýzy ukázali, že ide o cytotyp s 2n = 22, ktorý vznikol fúziou chromozómov a stratou časti DNA (Mandáková, nepubl.).

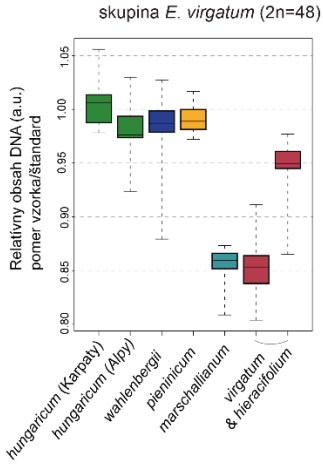
Pri analýzach široko-chápaného druhu *E. witmannii* s.l. (zahŕňajúceho *E. witmannii* s.str., *E. transsilvanicum*, *E. pallidiflorum*) sme namerali u väčšiny jedincov očakávanú diploidnú úroveň, zodpovedajúcu cytotypu 2n = 14, ale v štyroch populáciách sme odhalili výskyt triploidných jedincov. Nečakaným, ale o to zaujímavejším, zistením bolo odhalenie dvojnásobných hodnôt obsahu DNA v Južných Karpatoch v pohoriach Piatra Craiului a Bucegi (obr. 4). Karyologické analýzy ukázali, že ide o zatiaľ nepoznaný cytotyp so 16 chromozómami (2n = 16, Mandáková, nepubl.).

V prípade druhu *E. carniolicum* sme namerali rôzne hodnoty obsahu DNA, ktoré tvorili tri neprekrývajúce sa skupiny – cytotypy (obr. 4). Karyologické analýzy potvrdili, že dva z nich zodpovedajú počtu 2n = 12 (Mandáková, nepubl.), hoci publikovaný bol počet 2n = 14 [9], kým pre tretí cytotyp počet chromómov zatiaľ nepoznáme. Cytotypy s výrazne odlišným obsahom DNA, ale rovnakým počtom chromozómov, sú pravdepodobne dôsledkom variability v repetitívnej DNA. Podobne pri druhu *E. vitekii* sme odhalili prítomnosť troch rôznych cytotypov s rôznym obsahom DNA. Pre cytotyp s najnižším obsahom DNA bol zistený počet 2n = 12 (Mandáková, nepubl), hoci publikovaný bol počet 2n = 14 [9]. Pre druh *E. kuemmerlei* boli zistené dva cytotypy (obr. 4), pričom prislúchajúce počty chromozómov ešte nie sú známe, okrem už publikovaného počtu 2n = 14 [9]. Rovnako aj pre druh *E. croaticum* sme zistili prítomnosť dvoch cytotypov (obr. 4), pričom publikovaný bol zatiaľ len počet 2n = 42 [9].



Obr. 4: Variabilita nameraných hodnôt relatívneho obsahu DNA (veľkosti genómu) metódou prietokovej cytometrie v jednotlivých druhoch, respektíve cytotypoch skupiny *Erysimum odoratum*. Uvedené sú počty chromozómov v prípadoch, kde sú známe, t.j. boli stanovené v rámci tejto práce alebo publikované inými autormi pre dané druhy, prípadne aj konkrétne analyzované populácie.

V skupine *E. virgatum* sme merali relatívny obsah DNA u 199 jedincov z 50 populácií. Doposiaľ boli v tejto skupine publikované hexaploidy 2n = 48 a len pre druh *E. hieracifolium* boli publikované aj tetraploidy 2n = 32 [9, 11, 12, 20, 24, 25]. Naše merania potvrdili prítomnosť hexaploidov ale s rozdielmi v obsahu DNA. Druhy *E. marschallianum, E. hieracifolium* a väčšina populácií *E. virgatum* z Álp mali menší genóm ako karpatské endemity *E. hungaricum, E. pieninicum* a *E. wahlenbergii*. Niekoľko populácií *E. virgatum* zo západných Álp malo prechodný obsah DNA medzi týmito dvoma skupinami (obr. 5). Taktiež naše výsledky ukázali, že vybrané populácie z východných Álp, ktoré autori Melzer & Polatschek [26] zaradili k *E. hungaricum*, veľkosťou genómu naozaj zodpovedali tomuto karpatskému endemitu. Ich taxonomickú príslušnosť bude potrebné doriešiť pomocou morfometrických a genetických analýz.



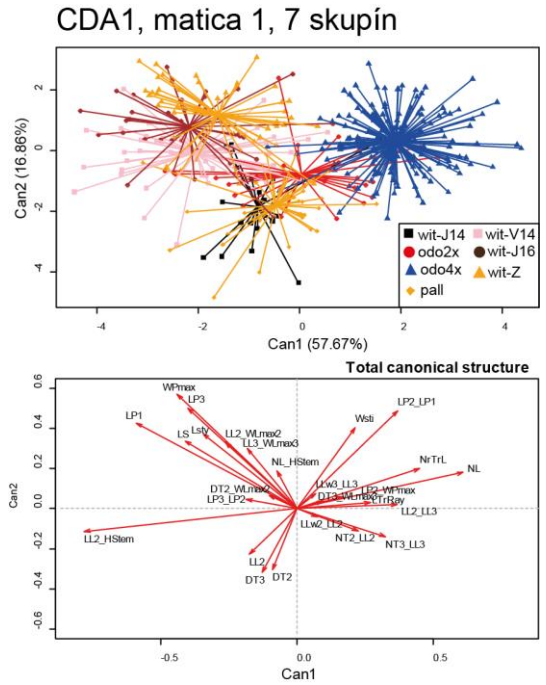
Obr. 5: Variabilita nameraných hodnôt relatívneho obsahu DNA (veľkosti genómu) metódou prietokovej cytometrie v jednotlivých druhoch skupiny *Erysimum virgatum*.

2.2 Morfometrické analýzy

Zhlukovacie a ordinačné analýzy (PCA, PCoA) ukázali veľké prekryvy v umiestnení jednotlivých druhov a cytotypov zo skupiny *E. odoratum* z Karpát, preto sme sa sústredili na prezentáciu výsledkov kanonických diskriminačných analýz (CDA), t.j. „hypotézy testujúcich analýz".

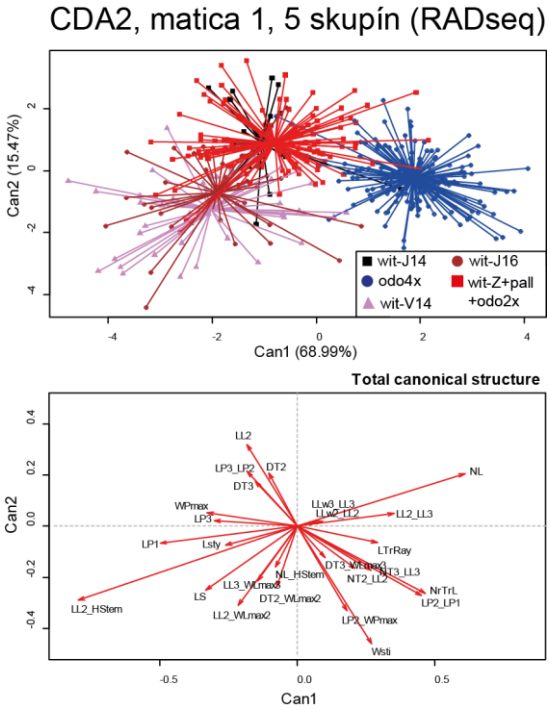
Do prvej kanonickej diskriminačnej analýzy (CDA1) sme zahrnuli sedem skupín definovaných a ohraničených podľa ich tradovanej determinácie,

geografického rozšírenia a zistených cytotypov: diploidné *E. odoratum* s.str., tetraploidné *E. odoratum* s.str., *E. pallidiflorum, E. witmannii* z Južných Karpát s 2n = 14, *E. witmannii* z Južných Karpát s 2n = 16, *E. witmannii* z Východných Karpát s 2n = 14 a *E. witmannii* zo Západných Karpát s 2n = 14. Ako môžeme vidieť na obrázku 6, tetraploidné *E. odoratum* sa od ostatných skupín oddeľuje najvýraznejšie, pozdĺž prvej osi, čo je dané hlavne kratším nechtíkom na korunných lupienkoch, širšou bliznou, väčším počtom trichómov na listoch a väčším počtom listov na stonke. Diploidné skupiny sa vzájomne výrazne prekrývajú; mierne posunuté pozdĺž druhej osi sú len *E. pallidiflorum* a *E. witmannii* z Južných Karpát s 2n = 14 v dôsledku výraznejšie zubatého okraja listov a dlhších listov v strednej časti stonky.



Obr. 6: Kanonická diskriminačná analýza so siedmimi definovanými skupinami druhov a cytotypov v skupine *E. odoratum*: diploidné *E. odoratum* s.str. (odo2x), tetraploidné *E. odoratum* s.str. (odo4x), *E. pallidiflorum* (pall), *E. witmannii* z Južných Karpát s 2n = 14 (wit-J14), *E. witmannii* z Južných Karpát s 2n = 16 (wit-J16), *E. witmannii* z Východných Karpát s 2n = 14 (wit-V14) a *E. witmannii* zo Západných Karpát s 2n = 14 (wit-Z). Vektory znázorňujú tzv. total canonical structure, ktoré vyjadrujú príspevok jednotlivých znakov ku kanonickým osiam.

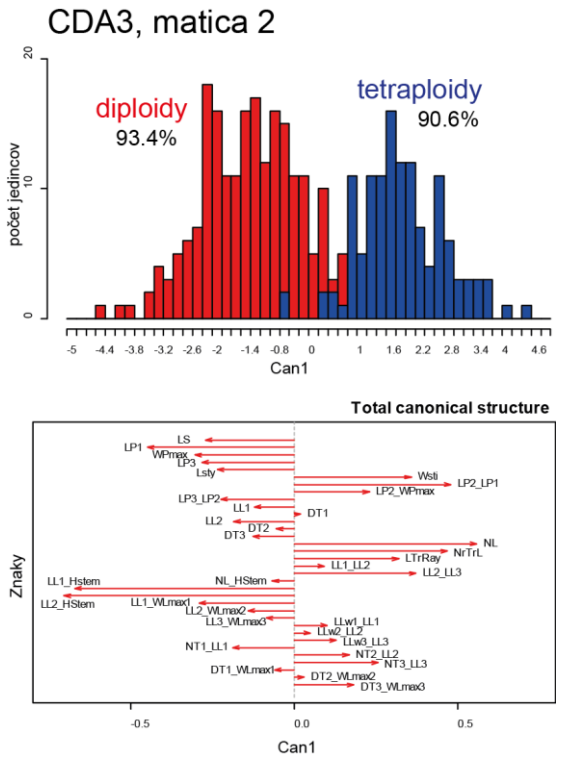
V druhej kanonickej diskriminačnej analýze (CDA2) sme na základe výsledkoch genetických analýz (RADseq, nepubl.) zoskupili všetky západokarpatské diploidy (t.j. diploidné *E. odoratum* s.str., *E. pallidiflorum* a *E. witmannii* zo Západných Karpát) do jednej skupiny, celkovo bolo teda definovaných 5 skupín (obr. 7). Opäť najviac diferencovanou skupinou bolo tetraploidné *E. odoratum* s.str. Takmer k úplnému prekryvu došlo medzi skupinami *E. witmannii* z Južných Karpát s 2n = 14 a západokarpatskými diploidmi (taktiež 2n = 14). Tieto sa však čiastočne odlišovali od *E. witmannii* z Južných Karpát s 2n = 16 a z Východných Karpát s 2n = 14, ktoré majú dlhšie listy v strednej časti stonky voči dĺžke stonky, užšie listy a dlhšie kališné lístky.



Obr. 7: Kanonická diskriminačná analýza s piatimi definovanými skupinami druhov a cytotypov v skupine *E. odoratum*: tetraploidné *E. odoratum* s.str. (odo4x), *E. witmannii* z Južných Karpát s 2n = 14 (wit-J14), *E. witmannii* z Južných Karpát s 2n = 16 (wit-J16), *E. witmannii* z Východných Karpát s 2n = 14 (wit-V14). Do jednej skupiny (wit-Z+pall+odo2x) sú spojené všetky západokarpatské diploidné populácie na základe ich genetickej celistvosti (RADseq, nepubl.). Vektory znázorňujú tzv. total canonical structure, ktoré vyjadrujú príspevok jednotlivých znakov ku kanonickým osiam.

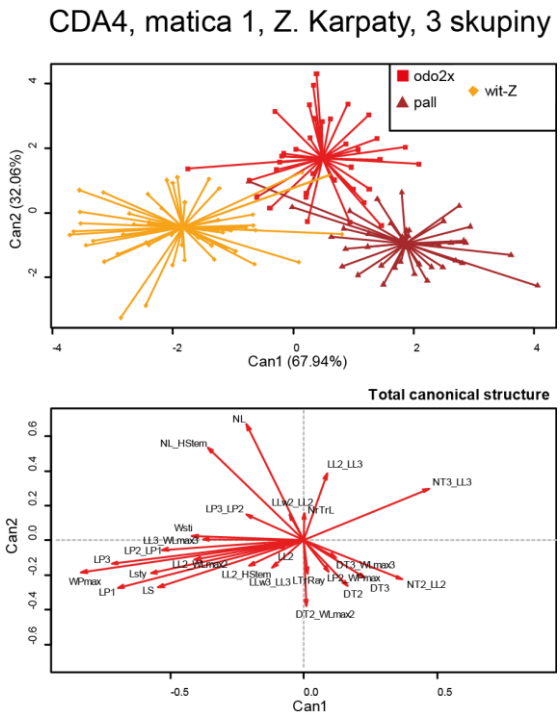
V tretej kanonickej diskriminačnej analýze (CDA3) sme testovali morfologické odlišnosti medzi tetraploidmi *E. odoratum* s.str. a všetkými diploidmi

(obr. 8). Zistili sme pomerne dobrú separáciu, kde sa tetraploidné *E. odoratum* s.str. odlišuje od diploidov väčším počtom listov, väčším počtom trichómov na listoch, kratším nechtíkom na korunných lupienkoch, širšou bliznou a vyššou hodnotou pomeru dĺžky stredného a vrchného listu. Klasifikačná diskriminačná analýza ukázala vyše 90% úspešnosť v zatriedení rastlín podľa ploidie.



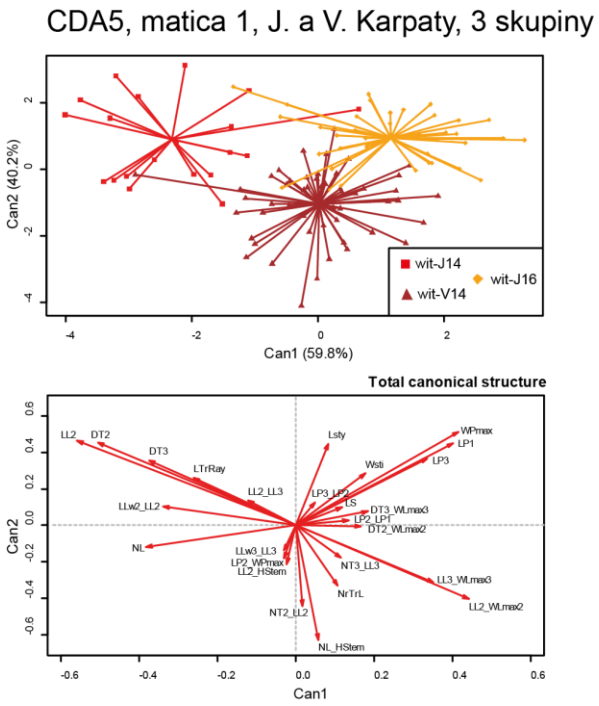
Obr. 8: Kanonická diskriminačná analýza a morfologické znaky diferencujúce tetraploidné *E. odoratum* s.str. od všetkých diploidov z Karpát. Uvedené percentá zodpovedajú výsledkom klasifikačnej diskriminačnej analýzy. Vektory znázorňujú tzv. total canonical structure, ktoré vyjadrujú príspevok jednotlivých znakov ku kanonickej osi.

Vo štvrtej kanonickej diskriminačnej analýze (CDA4) sme sa zamerali na diploidné druhy Západných Karpát, t.j. diploidné *E. odoratum* s.str., *E. pallidiflorum* a *E. witmannii* s.str. (obr. 9). Všetky tri skupiny boli dobre diferencované, čo však ovplyvňuje už aj menší počet analyzovaných populácií. Diploidné *E. odoratum* s.str. sa líšilo väčším počtom listov celkovo a aj v pomere k dĺžke stonky, tiež v pomere dĺžky stredných a vrchných listov. *E. witmannii* s.str. sa odlišuje najmä dlhšími kvetnými časti a širšími korunnými lupienkami. *E. pallidiflorum* sa od ostatných líši výraznejšou zubatosťou listov.



Obr. 9: Kanonická diskriminačná analýza s troma druhmi diploidov zo skupiny *E. odoratum* v Západných Karpatoch: diploidné *E. odoratum* s.str. (odo2x), *E. pallidiflorum* (pall) a *E. witmannii* s.str. zo Západných Karpát (wit-Z). Vektory znázorňujú tzv. total canonical structure, ktoré vyjadrujú príspevok jednotlivých znakov ku kanonickým osiam.

A napokon piata kanonická diskriminačná analýza (CDA5) zahŕňala 3 skupiny diploidov *E. witmannii* s.l. z Južných a Východných Karpát (obr. 10). Najlepšie diferencovaná bola skupina *E. witmannii* z Južných Karpát s 2n = 14 (zastúpená bola však len jednou populáciou) na základe dlhších listov v strednej časti stonky a výraznejšie zubatého okraja listov. *E. witmannii* z Južných Karpát s 2n = 16 sa od ostatných dvoch skupín diferencovalo najmä dlhšími a širšími korunnými lupienkami.



Obr. 10: Kanonická diskriminačná analýza s troma skupinami diploidov *E. witmannii* s.l. v Južných a Východných Karpatoch: populácie z Južných Karpát s 2n = 14 (wit-J14), z Južných Karpát s 2n = 16 (wit-J16) a z Východných Karpát s 2n = 14 (wit-V14). Vektory znázorňujú tzv. total canonical structure, ktoré vyjadrujú príspevok jednotlivých znakov ku kanonickým osiam.

Záver a perspektívy ďalšieho štúdia

Na základe prezentovaných výsledkov cytometrických meraní sa ukazuje, že karyologická variabilita v skupine *E. odoratum* je významná a ešte rozsiahlejšia ako bolo doposiaľ publikované. Vo väčšine rozlišovaných druhov sme zistili prítomnosť aspoň dvoch rôznych cytotypov líšiacich sa obsahom DNA, ktoré boli v niektorých prípadoch sprevádzané aj zmenou počtu chromozómov, kým v iných neboli, čo poukazuje na variabilitu v repetitívnej DNA. Aj v hexaploidoch zo skupiny *E. virgatum* sme zistili variabilný obsah DNA, ktorý sa ukazuje byť taxonomicky aj geograficky korelovaný. Výsledky morfometrických analýz v skupine *E. odoratum* ukázali, že morfologické odlišnosti medzi tradične rozlišovanými druhmi a cytotypmi v Karpatoch sú celkovo malé. Kombináciou viacerých vybraných morfologických znakov sa pomerne dobre dajú odlíšiť tetraploidy od diploidov. Morfologická diferenciácia rôznych diploidov v Karpatoch je však slabá; dokážeme ich odlíšiť len ak sa analyzujú samostatne populácie zo Západných Karpát a samostatne z Južných a Východných, čo však už môže byť spôsobené aj malým počtom meraných populácií. Z vyššie uvedeného vyplýva potreba detailnejšieho výskumu týchto dvoch skupín, ktorých súčasťou sú endemity strednej Európy a Karpát vrátane Slovenska, na fylogenetickej, karyologickej a morfometrickej úrovni. V pláne je podrobnejšie štúdium morfologickej variability, plasticity a diferenciácie druhov a cytotypov zahŕňajúce väčšie množstvo populácií, ako aj jedince pestované v rovnakých podmienkach. Taktiež sa plánuje detailná rekonštrukcia fylogenetických vzťahov, evolúcie skupín, pôvodu rôznych cytotypov a polyploidov s použitím molekulárnych a cytogenomických metód.

Poďakovanie

Tento príspevok bol vypracovaný s podporou projektu APPV-21-0044. Touto cestou by som sa rád poďakoval vedúcemu grantu prof. Karolovi Marholdovi ako aj všetkým riešiteľom za to, že som mal možnosť participovať na tomto projekte. Tiež by som rád poďakoval mojej školiteľke Mgr. Judite Zozomovej, PhD. za profesionálny prístup, odborné rady a zasvätenie do problematiky. V neposlednom rade by som rád poďakoval aj RNDr. Barbore Šingliarovej, PhD. a RNDr. Kataríne Skokanovej, PhD., ktoré mi boli tútorkami pri cytometrických meraniach a analýze dát v Centre biológie rastlín a biodiverzity SAV, v.v.i. na pracovisku v Banskej Bystrici, a tiež Doc. Ingrid Turisovej, PhD. za vedenie bakalárskej práce, spoločné terénne cesty do Rumunska a zázemie na domovskej katedre. Napokon ďakujem aj RNDr. Terezii Malík Mandákovej, PhD. (CEITEC, Brno) za spoluprácu a poskytnutie nepublikovaných výsledkov cytogenetických analýz.

Použitá literatúra

[1] MOAZZENI, Hamid et al. 2014. Phylogenetic perspectives on diversification and character evolution in the species-rich genus *Erysimum* (Erysimeae; Brassicaceae) based on a densely sampled ITS approach in Botanical Journal of the Linnean Society, 175: 497-522.

[2] ZÜST, Tobias et al. 2020. Independent evolution of ancestral and novel defenses in a genus of toxic plants (*Erysimum*, Brassicaceae) in eLife, 9: e51712.

[3] CZARNA, Aneta et al. 2016. Morphological and molecular variation in selected species of *Erysimum* (Brassicaceae) from Central Europe and their taxonomic significance in Flora, 222: 68-85.

[4] KIEFER, Markus et al. 2014. BrassiBase: Introduction to novel knowledge database on Brassicaceae evolution in Plant and Cell Physiology, 55(1): 1- 9.
[5] OSUNA-MASCARÓ, Carolina et al. 2023. Hybridization and introgression are prevalent in Southern European *Erysimum* (Brassicaceae) species in Annals of Botany, 131: 171-183.
[6] OSUNA-MASCARÓ, Carolina. 2020. Hybridization as an evolutionary drivers for speciation: a case in the Southern European *Erysimum* species : PhD thesis. Granada : Universidad de Granada, 291 pp.
[7] OSUNA-MASCARÓ, Carolina et al. 2023. Lack of ITS sequence homogenization in *Erysimum* species (Brassicaceae) with different ploidy levels in Scientific Reports, (2022) 12: 16907.
[8] POLATSCHEK, Adolf. 2008. *Erysimum* (Brassicaceae): 15 neue Arten aus Europa, N-Afrika und Asien in Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, 109 B: 147-165.
[9] POLATSCHEK, Adolf. 2013. Revision der Gattung *Erysimum* (Cruciferae): Teil 5. Nord-, West-, Zentraleuropa, Rumänien und westliche Balkan Halbinsel bis Albanien in Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, 115: 75-218.
[10] POLATSCHEK, Adolf. 2015. *Erysimum diffusum* Ehrh. (Cruciferae) new for Greece in Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, 117: 277-278.
[11] JALAS, Jaakko – SUOMINEN, Juha. 1994. Atlas Florae Europaeae. Distribution of Vascular Plants in Europe: 10 Cruciferae (Sisymbrium to Aubrieta) in 1st ed. Helsinky : The Committee for Mapping the Flora of Europe & Societas Biologica Fennica Vanamo. pp. 49-88.
[12] BALL, Peter William. 1993. *Erysimum* L. In TUTIN, Thomas Gaskell, et al. Flora Europaea, vol. 1: Psilotaceae to Platanaceae. Ed. 2. Cambridge : Cambridge University Press, 1993. pp. 325-335.
[13] Brassicaceae. In Euro+Med Plantbase – the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. [online]. The Euro+Med PlantBase: 2011 [cit. 28.2.2024]. Dostupné z: http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/PTaxonDetail.asp?NameCache=Erysimum&PTRefFk=72%2000000.
[14] SLIWINSKA, Elwira et al. 2021. Application-based guidelines for best practices in plant flow cytometry in Cytometry, 2021: 1-33.
[15] KOLARČIK, Vladislav. 2021. Základy prietokovej cytometrie v rastlinnej biológii, Praktická analýza obsahu DNA v bunkovom jadre. Košice : Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach, Vydavateľstvo ŠafárikPress, 2021. 72 pp. ISBN 978-80-574-0047-9.
[16] SUDA, Jan. 2004. An employment of flow cytometry into plant biosystematics : PhD. Thesis Prague : Charles University in Prague, 50 pp.
[17] DOLEŽEL, Jaroslav – Greilhuber, Johann – SUDA, Jan. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry in Nature Protocols Vol.2 No.9: 2233-2344.
[18] MARHOLD, Karol. Multivariate morphometrics and its application to monography at specific and infraspecific levels. In: Stuessy, Tod et al. (eds.) Monographic plant systematics: Fundamental assessment of plant biodiversity, 1st. ed. Vienna : International Association for Plant Taxonomy, 2011 pp. 73-99. ISBN 978-3-906166-98-8.
[19] MARHOLD Karol – SUDA Jan. 2008. Štatistické spracovanie mnohorozmerných dát v taxonómii (Fenetické metódy). Bratislava : Katedra zoológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. 140 pp.
[20] MICHALKOVÁ, Eleonóra. 2002. *Erysimum* L. In GOLIAŠOVÁ, Kornélia & ŠÍPOŠOVÁ, Helena (eds) Flóra Slovenska V/4. Bratislava : Veda, vydavateľstvo SAV, 2002. pp.182-224.
[21] PECCENINI, Simonetta – POLATSCHEK, Adolf. 2014. The genus *Erysimum* (Brassicaceae) in Italy, part II: Description of new species and subspecies in Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, 16: 107-117.
[22] ImageJ, U. S. National Institute of Health. [online]. ImageJ: 2018 [cit. 28.2.2024]. Dostupné z: https://imagej.net/ij/download.html.
[23] ŠLENKER, Marek – KOUTECKÝ, Peter – MARHOLD, Karol. 2022. MorphoTools2: An R package for multivariate morphometric analysis in Bioinformatics, 38: 2954-2955
[24] MARHOLD, Karol et al. 2007. Chromosome number survey of the ferns and flowering plants of Slovakia. Bratislava : VEDA, 2007. 649 pp. ISBN 97- 88022-409-803.
[25] KLIMENT, Ján – TURIS, Peter – JANIŠOVÁ, Monika. 2016. Taxa of vascular plants endemic to the Carpathian Mts in Preslia, 88: 19-76
[26] MELZER, Von Hulmet – POLATSCHEK, Adolf. 1971. *Erysimum hungaricum* Zapał. – auch in den Ostalpen in Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, 75: 103-109.

Monitoring prítomnosti patogénov na povrchu osiva vybraných druhov zeleniny z čeľade *Brassicaceae*

Monitoring the presence of selected targets on the seed surface of vegetable species from the *Brassicaceae* family

Kamila Bariová[1]
Školiteľ: Zuzana Gerši[1]
[1]Oddelenie biológie, Ústav biológie a biotechnológie FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
bariova1@ucm.sk, zuzana.gersi@ucm.sk

Abstrakt
Aktuálnym problémom pre poľnohospodárov je nepriaznivé počasie. V dôsledku toho dochádza k šíreniu bakteriálnych patogénov, čo vedie k vzniku rôznych ochorení a znižovaniu úrody zeleniny. V súčasnosti stále chýbajú rýchle a spoľahlivé metódy boja proti týmto bakteriózam pre efektívnu kontrolu kvality osiva.
V práci sa venujeme aktuálnej téme monitoringu prítomnosti vybraných patogénov na povrchu osiva 7 druhov zeleniny (čeľade *Brassicaceae*). Detegovali sme baktérie *Xanthomonas campestris, Pseudomonas syringae a Clavibacter michiganensis*.
Pomocou PCR analýzy sme identifikovali prítomnosť baktérií *Xanthomonas campestris pv. campestris* na povrchu osiva 3 druhov z čeľade kapustovité. LAMP metódou sme detegovali prítomnosť patogénu *Pseudomonas syringae* v 2 zo 7 testovaných druhov *Brassica* sp.
Kľúčové slová*: Brassica sp., Clavibacter,* patogén, *Pseudomonas, Xanthomonas.*

Abstract
The current problem for farmers is unfavorable weather. As a result, the spread of bacterial pathogens occurs, which leads to the emergence of various diseases and the reduction of vegetable yields. Currently, there is still a lack of rapis and reliable methods of combating these bacterioses for effective seed quality control.
In this work, we deal with the current topic of monitoring the presence of selected pathogens on the seed surface of 7 species of vegetable (Brassicaceae family). We detected the bacteria *Xanthomonas campestris, Pseudomonas syringae* and *Clavibacter michiganensis.* Using PCR analysis, we identified the presence of bacteria *X. campestris pv. campestris* on the seed surface of 3 species from the cabbage family. Using the LAMP method, we detected the presence of the pathogen *Pseudomonas syringae* in 2 of the 7 tested species of Brassica sp.
Key Words: *Brassica sp., Clavibacter,* pathogen, *Pseudomonas, Xanthomonas.*

Úvod

Čeľaď Brassicaceae zahŕňa 52 kmeňov, do ktorého patrí vyše 350 rodov a 3 977 druhov, z ktorých niekoľko poddruhov má veľký hospodársky význam [1].

Xanthomonas patrí medzi gram-negatívne baktérie z čeľade Xanthomonadaceae [2] a podtriedy Gammaproteobacteria, ktorá obsahuje rôzne druhy spôsobujúce choroby u viac ako 400 rôznych rastlinných hostiteľov [3].

Baktéria *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm) spôsobuje bakteriálne rakovinové ochorenie paradajok [4], ale nie je vylúčené, že napáda aj iné rastlinné druhy.

P. syringae je fytopatogénny. Jeho patovary sa vyznačujú rôznym stupňom patogenity [5] a infikuje takmer všetky ekonomicky dôležité druhy plodín) [6].

Potvrdiť prítomnosť tých patogénov je možné pomocou PCR testu na detekciu patogénov v semenách, aby si pestovatelia moli byť istí, že ich sadivový materiál je infikovaný alebo nie je [7]. Ďalšou spoľahlivou metódou je detekcia pomocou LAMP primerov, ktorá bola už vo viacerých štúdiách preukázaná ako spoľahlivá diagnostická metóda na špecifickú detekciu a identifikáciu rožných patogénov [8]. Nie je to však vždy jednoduché nakoľko rozdiely medzi patovarmi sú minimálne a identifikácia nemusí byť vždy presná.

Cieľom práce bolo posúdiť kvalitu osiva vybraných druhov zeleniny z čeľade kapustovité z hľadiska

bakteriálnej patogenity a poskytnúť producentom osiva návrh na rýchlu a efektívnu detekčnú metódu pre odhalenie vybraných patogénov z rodu *Pseudomonas, Clavibacter* a *Xanthomonas* na povrchu osiva ponúkaného k predaju.

1 Materiál a metódy

Ako zdroj biologického materiálu sme použili osivo vybraných kultivarov kapusty (*Brassica sp.)* od spoločnosti Moravoseed: kapusta hlávková neskorá – *Brassica oleracea var. capitata* (cv. Madison), brokolica skorá – *Brassica oleracea var. Italica* (cv. Limba), kel kučeravý – *Brassica oleracea var. sabauda* (cv. Scarlet) a kaleráb raný - *Brassica oleracea var. gongylodes* (cv. Kref F1) a ďalšie vzorky od spoločnosti Agroseel: karfiol stredne skorá – *Brassica oleraceae var. botrytis* (cv. C. Moldovita F1), a brokolica – *Brassica oleracea var. Italica* (cv. Calabresse Natalino), od spoločnosti Garafarm: kapusta hlávková stredne skorá – *Brassica oleracea var. capitata* (cv. Braunschweigi).

1.1 Eluácia potenciálnych patogénov z povrchu osiva

Vzorky osiva (0,5 g semien) sme pretrepávali 2,5 h v sterilnej H_2O (5 ml) pri laboratórnej teplote na orbitálnej trepačke (125 ot./min.). Takto získaný eluát s potenciálne prítomnými patogénmi sme použili v ďalších analýzach.

1.2. Príprava biologického materiálu

Získané eluáty (20 µl) sme naniesli na povrch živného média (0,5 % peptón, 0,3 % hovädzí extrakt, 1,5 % agar) v Petriho miskách (Ø 4 cm) a vzorky kultivovali v termostate pri teplote 30 °C počas 48 h. Vyrastené kolónie sme pomocou sterilného špáradla odpichli a rozsuspendovali v 5 µl 1 % (v/v) Triton X-100. Takto získanú bunkovú suspenziu sme v ďalších analýzach používali ako templát DNA. Koncentrácia DNA bola upravená na približne 50 $ng.\mu l^{-1}$.

1.3 Detekcia bakteriálnych patogénov na povrchu osiva pomocou PCR analýzy

Pomocou štandardnej PCR metódy sme detegovali expresiu génu pre 16S rRNA pre zistenie bakteriálnej patogenity v testovaných vzorkách a následne expresiu génu *Rhs, HrpF* pre detekciu prítomných patogénov *Xanthomonas campestris, Pseudomonas syringae a Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis.*

Reakčnú zmes sme pripravili podľa odporúčaní výrobcu KAPA 2g Fast Hot Star Reasy Mix PCR (Sigma Aldrich). Reakčná zmes s celkovým obsahom 25 µl obsahovala 23 µl Master Mixu (-12,5 µl Kapa 2G Fast Hot Star Ready Mix (2X), 10,5 µl PCR H_2O), 1 µl bunkovej suspenzie (templát DNA) a po 0,5 µl z príslušných primerov (10 µM) (Tabuľka 1). Do PCR reakcie sme použili vždy čerstvo pripravené bakteriálne suspenzie. Reakcia bola uskutočnená v termocykléri (Bio-Rad) s použitým teplotného profilu: počiatočná denaturácia pri 95°C/5 min.; 35 opakovaní (95 °C/1 min., *54 °C – 75,3°C/2 min., 72 °C/1 min.) a konečné predĺženie pri 72°C /15 min. Teplotné režimy pre detekciu génov *HrpF, Rhs* boli upravené podľa autorov (Tabuľka 1).

Tabuľka 1 Sada primer párov testovaných v experimente pre detekciu prítomnosti patogénov v zelenie.

Detegovaný gén patogén, veľkosť fragmentu, teplota hybridizácie primerov*, literárny zdroj	**Sekvencia primerov (5´→3´)**
16S rRNA 500 bp, 54°C	F:CTYAAAKRAATTGRCGGRRRSSC
	R:CGGGCGGTGTGTRCAARRSSC
Cmm, 600 bp, 60,2°C	F:CGCGAATAAGCCCATATCAA
	R:CGTCAGGAGGTCGCTAATA
Pst, 600 bp, 75,3°C	F:AGTTGATCATCGAGGGCGC(AT)GCC
	R:TGATCGGTTTGATCTCGCACGG
Xcc1, 190 bp, 68°C	F:CGTGTGGATGTGCAGACC
	R:CAGATCTGTCTGATCGGTGTCG
Rhs Xcv, 517 bp, 60°C, [9]	F: AGAAGCAGTCCTTGAAGGCA R: AATGACCTCGCCAGTTGAGT
HrpF Xcc2, 619 bp, 60°C, [7]	F: CCG TAG CAC TTA GTG CAA TG
	R: GCA TTT CCA TCG GTC ACG ATTG
HrpF Xcc3, 535 bp, 60°C, [10]	F: CGA TTC GGC CAT GAA TGA CT
	R: CTG TTG ATG GTG GTC TGC AA

F- priamy primer, R – spätný primer.

Výsledky PCR produktu sme separovali v 1 % (w/v) agarózovom géli s 1 µg/ml edítium bromidu, vizualizovali pomocou UV-transiluminátora a fotograficky zdokumentovali (SmartView Pro 1100, Major Science). Pre kvalitné vyhodnotenie získaných

fragmentov sme používali marker molekulových hmotností Quick-Load Purple 100 bp DNA Ladder.

1.4 Detekcia *Pseudomonas syringae pv. Brassicaceae* pomocou LAMP primerov

Na základe špecifických navrhnutých LAMP primerov pre *P. syringae pv. Brassicaceae* sme boli schopní v krátkom čase posúdiť prítomnosť/absenciu skúmaného bakteriálneho druhu vo vzorkách. Sada LAMP primerov použitých pre detekciu patogénu *P. syringae pv. Brassicaceae* :

LAM PS F3 5´ - TTGCAGTCGGTTTCGTCG – 3´
LAM PS B3 5´ - GCGCAGCGCTGGATTG – 3´
LAM PS FIP 5´-TTGCCCGTCGGGTTAGCCG-GGGTACACCGGTCGACAAT – 3´
LAM PS B-Loop 5´- TGCAACGCGGGCTGGAA-3´

Reakčnú zmes (Tabuľka 2) s obsahom 4 LAMP primerov sme pripravili podľa odporúčania výrobcu použitej súpravy Saphir Bst Turbo GreenMaster (Jena Bioscience). Vzorky s celkovým objemom 20 µl sme inkubovali v termostate pri teplote 65 °C počas 20 min. Výsledky amplifikácie sme vizualizovali pomocou UV-transiluminátora.

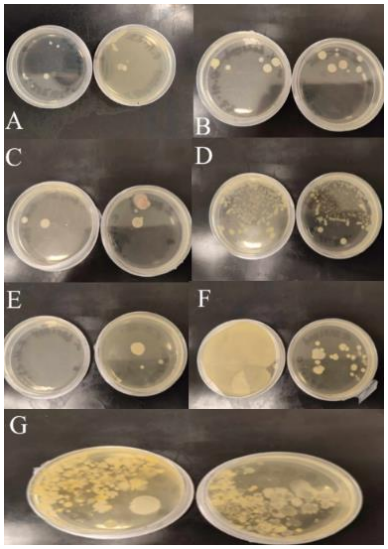
Tabuľka 2 Sada testovaných párov primerov v experimente pre detekciu prítomnosti patogénov v zelenine.

Reakčná zložka	Objem (µl)
Saphir Bst Turbo Buffer	2
$MgSO_4$ Stock (2mM)	1,6
dNTP Mix (1,5 µM)	2,8
Primer Mix	2
Saphir Bst Turbo Polymeráza	0,8
EvaGreen DNA Stain	0,26
DNA	2
H_2O	8,54

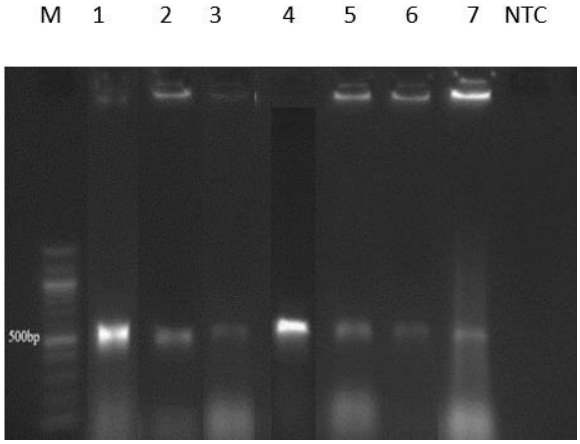
2 Výsledky a diskusia

Po 48 h kultivácie eluátov z povrchu osiva sme pozorovali lesklé kolónie, bieleho až žltého sfarbenia (Obrázok 1).

Pomocou primerov pre detekciu úseku génu 16S rRNA s veľkosťou 500 bp sme identifikovali prítomnosť bakteriálnych patogénov vo všetkých 7 testovaných vzorkách osiva (Obrázok 2).



Obrázok 1 Kolónie baktérií patogenizujúcich na povrchu osiva testovaných druhov zeleniny z čeľade *Brassicaceae*. A – kapusta hlávková neskorá (cv. Madison), B – brokolica (cv. Limba), C – kel kučeravý (cv. Scarlet), D – kaleráb raný (cv. Kref1), E – karfiol stredne skorý (cv. C. Moldovita F1), F – kapusta hlávková stredne skorá (cv. Braunschweigi), G – brokolica (cv. Calabresse Natalino)



Obrázok 2 Elektroforeogram PCR amplikónov v 1 % agarózovom géli po amplifikácii fragmentov DNA (500 bp) špecifických pre 16S rRNA. M – štandard molekulových hmotností (Quick-Load Purple 100 bp DNA Ladder), 1 – kapusta hlávková neskorá (cv. Madison), 2 – brokolica skorá (cv. Limba), 3 – kel kučeravý (cv. Scarlet), 4 – kaleráb raný (cv. Kref1), 5 – karfiol stredne skorý (cv. C. Moldovita F1), 6 – kapusta hlávková stredne skorá (cv. Braunschweigi), 7 – brokolica (cv. Calabresse Natalino), NTC – negatívna kontrola.

Následne sme sadou 6 špecifických pár primerov (Tabuľka 1) pomocou PCR detegovali prítomnosť bakteriálnych patogénov *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm), *P. syringae pv. syringae* (Pst) *a 2 kmene Xanthomonas campestris*

(Xanthomonas campestris pv. campestris (Xcc) *a Xathomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv)) s cieľom identifikovať, ktoré zo 7 vzoriek osív čeľade kapustovité sú týmito patogénmi infikované.

Prítomnosť baktérií *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* a *P. syringae cv. syringae* sme nepotvrdili ani v jednej zo 7 testovaných vzoriek osiva.

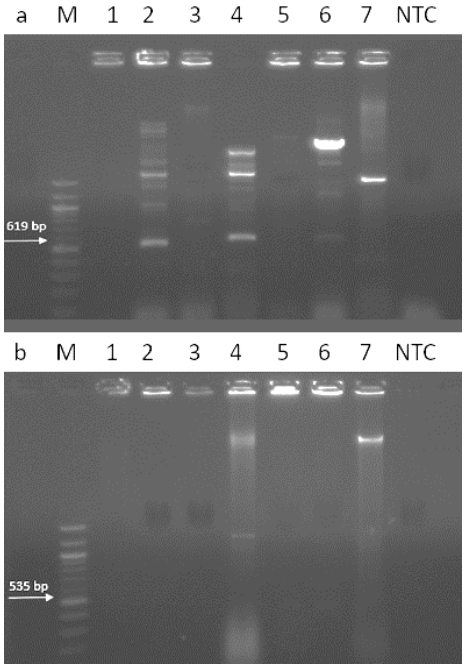
Bakteriálny kmeň *Xanthomonas campestris* sme identifikovali použitím viacerých pár primerov (Tabuľka 1). Konkrétne sme použili 3 rôzne páry primerov pre gén *HrpF* s cieľom detegovať patovar *Xanthomonas campestris pv. campestris* a 1 pár primerov pre gén *Rhs* na identifikáciu prítomnosti patovaru *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

V experimente pre identifikáciu *X. campestris pv. campestris* sme pomocou pár primeru Xcc2 (Tabuľka 1) zachytili fragment s veľkosťou 619 bp pre úsek génu *hrpF* vo vzorkách osiva kalerábu hybridného kultivaru Kref F1 a kapusty stredne skorej kultivar Braunschweigi. Výsledok tohto experimentu je však nejednoznačný, nakoľko ani zvýšením teploty vo fáze hybridizácie primerov sme nedokázali eliminovať vzniknuté nešpecifické fragmenty. Táto analýza si vyžaduje ďalšiu optimalizáciu, resp. sekvenovanie získaného fragmentu pre potvrdenie zachytenia požadovaného úseku génu *HrpF* (Obrázok 3a).

Pomocou pár primerov Xcc3 (Tabuľka 1) sme amplifikovali úsek génu *HrpF* (používaný pre rozlíšenie patovarov *X. campestris*) s veľkosťou 535 bp vo vzorkách osiva karfiolu stredne skorého (cv. Moldovita F1) a bielej hlávkovej kapusty (cv. Braunschweigi), čím sme identifikovali 2 vzorky semien infikované baktériou *X. campestris pv. campestris* (Obrázok 3b).

V predošlých štúdiách amplifikovali fragmenty s veľkosťou 619 bp [7] a 535 bp [10] v rámci detekcie *HrpF* génu s cieľom dokázať prítomnosť *X. campestris pv. campestris* vo viacerých druhoch kapusty.

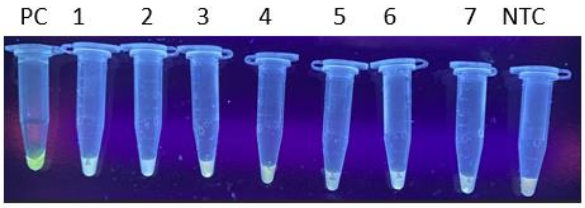
Pár primerov pre špecifickú detekciu patovaru *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* bol navrhnuté na gén *Rhs*. Pomocou týchto primerov (Tabuľka 1) použitých v PCR reakcii sme nezaznamenali prítomnosť bakteriálneho patovaru *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* v žiadnej zo študovaných vzoriek osiva.



Obrázok 3 Elektroforeogram PCR detekčnej analýzy baktérie *Xanthomonas campestris pv. campestris* na povrchu osiva vybraných druhov zeleniny z čeľade kapustovité pomocou páru primerov Xcc2 (**a**) a Xcc3 (**b**). M – marker, 1 – kapusta hlávková neskorá (cv. Madison), 2 – brokolica skorá (cv. Limba), 3 – kel kučeravý (cv. Scarlet), 4 – kaleráb raný (cv. Kref1), 5 – karfiol stredne skorý (cv. C. Moldovita F1), 6 – kapusta hlávková stredne skorá (cv. Braunschweigi), 7 – brokolica (cv. Calabresse Natalino), NTC – negatívna kontrola.

V ďalšej štúdii detegovali prítomnosť patogénu *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* v 6 vzorkách kapusty pestovanej v Kórei pomocou špecifických primerov pre úsek *Rhs* génu s veľkosťou 517 bp [9].

Detekciu patogénu *Pseudomonas syringae* v 7 vybraných vzorkách osiva kapustovín od 3 rôznych spoločností sme uskutočnili pomocou LAMP metódy. Pri tejto analýze sme použili sadu 4 špecifických LAMP pirmerov. Pri vyhodnotení sme zo 7 testovaných vzoriek osiva potvrdili patogenitu *Pseudomonas syringae* v 2 testovaných vzorkách osiva, a to kel (cv. Scarlet) a kareláb (cv. Kref1) (Obrázok 4). Pri ostatných detegovaných vzorkách sme nepotvrdili fluoreskujúce zafarbenie ako dôkaz prítomnosť patogénu *P. syringae* v testovanom osive. Experiment si vyžaduje potvrdenie pomocou konvenčnej PCR alebo RT-PCR analýzy, nakoľko v našej štúdii sme nepotvrdili patogenitu *P. syringae* na základe PCR detekcie.



Obrázok 4 Detekcia patogénov *P. syringae* pomocou špecifických LAMP primerov. PC – pozitívna kontrola (DNA izolovaná z baktérií *P. syringae* dodané v MENDELU v Brne), 1 – kapusta hlávková neskorá (cv. Madison), 2 – brokolica skorá (cv. Limba), 3 – kel kučeravý (cv. Scarlet), 4 – kaleráb raný (cv. Kref1), 5 – karfiol stredne skorý (cv. C. Moldovita F1), 6 – kapusta hlávková stredne skorá (cv. Braunschweigi), 7 – brokolica (cv. Calabresse Natalino), NTC – negatívna kontrola.

P. syringae bol detegovaný aj v pletivách paradajky. V tomto experimente autori preukázali, že metóda LAMP bola citlivejšia pre zachytenie tohto bakteriálneho patogénu v porovnaní s PCR analýzou [11].

Záver

Čeľaď *Brassicaceae* zahŕňa mnoho druhov, ktorých vitalitu a výnosnosť ovplyvňujú rôznorodé stresové faktory ako patogény (baktérie, huby, plesne, vírusy) a iní škodcovia.

V práci sme sa zamerali na detekciu vybraných kmeňov bakteriálnych patogénov potenciálne prítomných na povrchu osiva 7 druhov zeleniny z čeľade kapustovité. Hodnotené vzorky od spoločnosti Moravoseed (skladované) boli výrobcom označené ako potenciálne napadnuté neznámym patogénom, zatiaľ čo osivo od spoločnosti Agroseel a Garafarm je voľne dostupné na trhu.

Pomocou univerzálnych primerov sme na základe detekcie úseku génu 16S rRNA potvrdili prítomnosť baktérií vo všetkých vzorkách. V PCR experimente sme použili 6 párov primerov s cieľom identifikovať prítomnosť baktérií *Xanthomonas campestris* (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris a Xanthomonas campestris pv. vesicatoria), Clavibacter michiganensis a P. sytingae.* Zistili sme nejednoznačnú infekciu spôsobenú bakteriálnym patovarom *Xanthomonas campestris pv. campestris* v 3 vzorkách osiva a použitím primerov Xcc2 pre detekciu *Hrp* génu, pričom použitím inej sady párov primerov (Xcc3) toho istého génu sme amplifikované fragmenty zaznamenali vo vzorkách karfiolu (cv. Moldovita) a kapusty hlávkovej stredne skorej (cv. Braunchweigi). Z uvedených výsledkov vyplýva, že na povrchu osiva stredne skorej odrody kapusty hlávkovej (cv. Braunschweigi) sme identifikovali *X. campestris pv. campestris* pomocou 2 rôznych párov primerov (Xcc2 a Xcc3 pre gén *HrpF*).

Ďalej sme pomocou LAMP metódy detegovali baktériu *P. syringae cv. syringae* na povrchu osiva kelu kučeravého odrody Scarlet a kalerábu raného (Kref1) (obe osivá od Moravoseed).

Hodnotenie kvality osiva v spoločnostiach, ktoré osivo produkujú s cieľom predaja pre malo- aj veľkoodberateľov je kľúčové. Práca prináša skríning bakteriálnej infekcie na povrchu osiva metódami PCR a LAMP a zároveň návrh možnosti časovo nenáročnej a efektívnej detekcie patogenity vybraných kmeňov baktérií napádajúcich druhy z čeľade kapustovitých pre producentov.

Táto práca bola podporená projektom INTERREG 304011X035.

Použitá literatúra

[1] ILLAHY, R. a kol. 2020. Pre- and Post- harvest Factor Affecting Glucosinolate Content in Broccoli, Frontiers in Nutrition. In Sec. Food Chemistry. https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00147, 2020, roč. 7, s. 1-38.

[2] NAKAYINGA, R. a kol. 2021. *Xanthomonas* bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture. In BMC Microbiol. ISSN 1471-2180, 2021, roč. 21, č. 1, s. 291.

[3] TIMILSINA S, a kol. 2020. *Xanthomonas* diversity, virulence and plant-pathogen interactions. In Nat Rev Microbiol. ISSN 1740-1526, 2020, roč. 18, č. 8, s. 415-427.

[4] TSITSEKIAN, D. a kol. 2021. *Clavibacter michiganensis* Downregulates Photosynthesis and Modifies Monolignols Metabolism Revealing a Crosstalk with Tomato Immune Responses. In J Mol Sci. ISSN 1422-0067, 2021, roč. 22, č. 16, s. 8442.

[5] PALLERONI, N. J. 2015. *Pseudomonas* . In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210, 2015, roč. 64, s. 231-251.

[6] XIN, XF., KVITKO, B., HE, SY. 2018. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. In Nat Rev Microbiol. ISSN 1740-1526, 2018, roč. 16, č. 5, s. 316-328.

[7] BERG T. a kol., 2005, PCR-based detection of *Xanthomonas campestris pathovars* in Brassica seed,In Australia, 2005, s. 416-427, ISSN 0032-0862.
[8] LI W. a kol. 2019, Loop-Mediated Isothermal Amplificatgion for the Detekcion of Xanthomonas arboricola pv. pruni in Peaches. In Planth Pathology J. 3019, r. 6, č. 35, s- 635-643, ISSN 1598-2254.
[9] PARK J.Y. a kol., 2009, Sensitive and specific detectio of *Xatnhomonas campestris pv. vesicatoria* by PCR using pathovar-specific primers based on *rhs* family gene sequencing. In National Institute of Agricultural Biotechnology, Rual Development Administration, Republic of Korea. 2009, č.164, r. 1, s. 36-42.
[10] PARK J. Y. a kol. 2004, Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris pv. campestris* by PCR using species-specific primers based on *hrpF* gene sequences. In National Institute of Agricultural Biotechnology, Rural Development Administration, Republic in Korea. 2004, r. 4, č. 159, s. 419-423.
[11] CHEN Z. D. 2020, Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Pseudomonas syringae pv*. tomato in planta. In Plant Pathology, 2019. s. 739-750.

Štruktúra a diverzita spoločenstiev pakomárov (*Chironomidae*) mestských pondov

Structure and diversity of non-biting midge communities (*Chironomidae*) in urban ponds

Silvia Bartóková[1]
Školiteľ: Ladislav Hamerlík[1]
[1]Katedra biológie, ekológie a životného prostredia, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica
sbartokova@student.umb.sk, ladislav.hamerlik@umb.sk

Abstrakt
Urbánne pondy sú malé vodné biotopy, ktoré sú pod tlakom urbanizácie a často zanedbávané ako objekty vedeckého výskumu. Čeľaď pakomárovité (Chironomidae) je skupina dvojkrídlovcov, ktorá je vzhľadom na ich kozmopolitné rozšírenie, veľkú druhovú diverzitu a rozmanitosť ekologických nárokov, ako aj kvantitatívnou dominanciou v týchto biotopoch ideálnou modelovou skupinou pre ich štúdium.

Cieľom tohto výskumu bolo opísať štruktúru a diverzitu spoločenstiev pakomárov urbánnych pondov, na pozadí environmentálnych premenných, ktoré boli merané jesennom období v čase odberu vzoriek makrozoobentou. Zaznamenali sme 38 taxónov pakomárov patriacich do troch podčeľadí, pričom najviac taxónov sme zaznamenali z podčeľade Chironominae. Najčastejšie zaznamenaným taxónom bol *Glyptotendipes* spp. z podčeľade Chironominae, kam patrí aj nový nález pre faunu Slovenska *Chironomus* cf. *Muratensis* zo štrkoviska Rapovce. Pri testovaní vzťahu diverzity s environmentálnymi a hydromorfologickými premennými sa nepotvrdil žiaden vzťah. Výsledky výskumu prispejú k všeobecnému poznaniu diverzity urbánnych pondov a môžu byť užitočné pre ich manažment.

Kľúčové slová: mestské pondy, pakomáre, environmentálne faktory, urbanizácia, biodiverzita

Abstract
Urban ponds are small aquatic habitats that are under pressure from urbanization and often neglected by aquatic ecologists. of the family of non-biting midges (Chironomidae) is a group of Diptera, which, due to its cosmopolitan distribution, great species diversity and variability of ecological requirements, represents an ideal model group for the study of the mentioned aquatic habitats.

The aim of this study was to determine the structure and diversity of Chironomidae communities in urban ponds and the characteristics of the environmental variables, which were measured in autumn at the time of macrozoobenthic samplings. We recorded 38 taxa of chironomids belonging to three subfamilies, with the subfamily Chironominae being the most abundant and richest in species/taxa. The most frequently recorded taxon was *Glyptotendipes* spp. from the subfamily Chironominae, which also includes a new record for the fauna of Slovakia, *Chironomus* cf. *muratensis*. When testing the relationship of diversity with environmental and hydromorphological variables, no relationship was confirmed. The results of the research will contribute to the general knowledge of the diversity of urban ponds and may be useful for their management.

Key words: urban ponds, midges, environmental factors, urbanization, biodiversity

Úvod

Predkladaný príspevok je súčasťou projektu „Pondy v mestskom prostredí - biodiverzita, nepôvodná biota a ekologická kvalita“, ktorý je zameraný na výskum štruktúry spoločenstiev bentických bezstavovcov nedostatočne známych mestských limnických biotopov, tzv, pondov. Mestské alebo inak nazývané aj urbánne pondy sú malé vodné biotopy, ktoré sú pod určitým tlakom urbanizácie, pretože sú situované v ich intravilánoch [1].

Skúmané bentické bezstavovce sú významné z hľadiska biodiverzity pôvodných aj nepôvodných druhov organizmov v daných biotopoch. Na rozdiel od rurálnych pondov, urbánne pondy vykazujú väčšiu biodiverzitu a sú často obývané ohrozenými a exotickými druhmi [2]. Prezentovaný príspevok sa sústreďuje na biodiverzitu a taxonomickú štruktúru čeľade pakomárovitých, ktorá patrí do radu

dvojkrídlovcov (Diptera) a často tvorí bohatú skupinu makroskopických bezstavovcov na rozmanitých biotopoch od tečúcich a stojatých vôd, po vysokohorské ľadovce [3]. Delíme ich do 11 podčeľadí, pričom väčšina druhov patrí do troch podčeľadí: Chironominae, Orthocladiinae a Tanypodinae [4, 5].

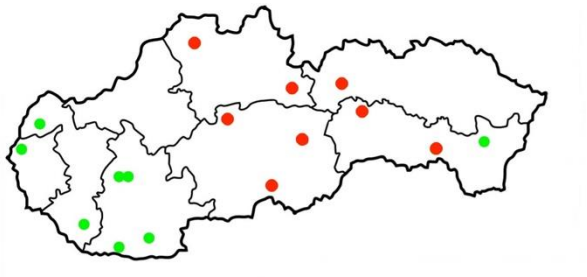
Hlavným cieľom výskumu je poznanie biologickej diverzity a taxonomickej štruktúry spoločenstiev pakomárov mestských pondov s dôrazom poukázať na dôležitosť rôznych typov pondov z hľadiska zachovania pôvodnej biodiverzity. Pre konkrétnu časť výskumu bolo zvolených 16 lokalít v rámci celého Slovenska, pričom časť pondov sa nachádzala v karpatskom a časť v panónskom ekoregióne. Konkrétne sme 1) opísali základné environmentálne premenné, 2) vyhodnotili taxonomické zloženie čeľade pakomárovitých a 3) vyhodnotili vplyv environmentálnych premenných na taxonomickú diverzitu pakomárov v študovaných urbánnych pondoch. Výsledky výskumu prispejú k doterajším útržkovým vedomostiam o biodiverzite, distribúcii a ekologickom stave týchto biotopov.

1 Materiál a metodika

V tejto kapitole si rozberieme charakteristiku lokalít, popíšeme si jednotlivé laboratórne práce a zanalizujeme dosiaľ nadobudnuté údaje.

1.1 Charakteristika lokalít

V tomto príspevku sú zahrnuté vzorky z 16 pondov v rámci celého Slovenska, pričom 8 pondov sa nachádzalo v karpatskom a 8 v panónskom ekoregióne (Obr. 1) . Najnižšie položenou lokalitou je Hurbanovo (Bohatá - 108 m n. m.), kým najvyššie položená je Poprad (Grébpark - 661 m n. m.). Plocha jednotlivých pondov sa pohybuje od 25 m^2 do 2 ha.



Obr. 1 Mapa lokalizácie sledovaných urbánnych pondov v rámci Slovenska (zelené – panónsky ekoregión, červené – karpatský ekoregión).

1.2 Terénne práce

Pre vzorkovanie spoločenstiev makrozoobentosu bola použitá štandardizovaná hydrobiologická sieť s rozmermi 25x25 cm s veľkosťou oka 0,5 mm. Pri semikvantitatívnom vzorkovaní z 25x25 cm plôch sa odoberali vzorky v litoráli, pričom sa na jednotlivých lokalitách pohyboval odber medzi 8-20 plôšok.

Počas odberu vzoriek boli merané aj fyzikálno-chemické parametre (pH, konduktivita, kyslík – obsah aj saturácia, teplota) za pomoci multimetrickej sondy In-Situ AQUATroll 400.

V tejto práci sú vyhodnotené výsledky odberov vzoriek a merania fyzikálno-chemických parametrov v jesennej sezóne.

1.3 Laboratórne práce a analýza údajov

V laboratóriu boli vzorky ručne spracované a pomocou binokulárnej lupy separované do jednotlivých taxonomických skupín. Od celkového množstva odobratých vzoriek závisela časová náročnosť spracovania a separácie. Následne boli larvy pakomárov triedené ešte do menších morfologicky podobných skupín a zakonzervované v 75 % roztoku etanolu. Pomocou binokulárneho mikroskopu, preparačných ihiel, podložných a krycích sklíčok, Berléseho zalievacieho média boli vzorky pakomárov spracované do trvalých preparátov. Napokon determinácia lariev prebiehala pomocou svetelného mikroskopu na najnižšiu možnú taxonomickú úroveň na základe determinačnej literatúry [3, 6, 7, 8]. Biologický materiál je uložený na Katedre biológie, ekológie a životného prostredia Fakulty prírodných vied, Univerzity Mateja Bela v Banskej Bystrici.

Vzťah diverzity spoločenstiev pakomárov mestských pondov od nadmorskej výšky, rozlohy, hĺbky, pH a teploty sme vyjadrili Spearmanovým korelačným koeficientom. Korelácie sme graficky zobrazili prostredníctvom lineárnej a polynomickej regresie.

2 Výsledky a diskusia

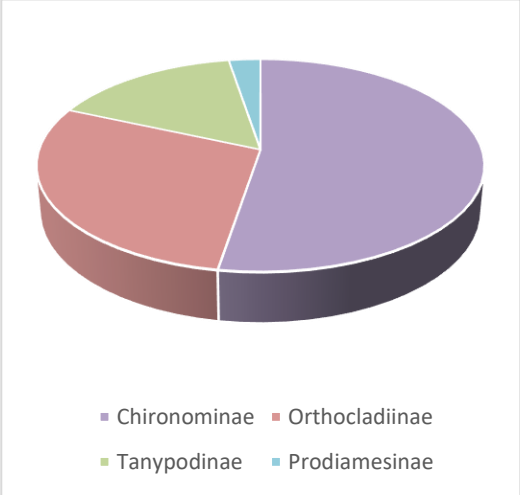
V tejto kapitole si rozoberieme dosiahnuté výsledky, ktoré porovnáme s ostatnými dosiahnutými štúdiami.

2.1 Štruktúra spoločenstva pakomárov

V rámci predkladaného príspevku bolo spracovaných 1943 lariev pakomárov zo 16 pondov. Celkovo bolo určených 38 taxónov, patriacich do 4 podčeľadí: Chironominae (20 taxónov), Orthocladiinae (11 taxónov), Tanypodinae (6 taxónov) a Prodiamesinae (1

taxón) (Obr. 2). Priemerne sa na lokalitách vyskytovalo 7 taxónov, pričom maximálny počet taxónov zistených na jednej lokalite bolo 15 (Tisovec - Veľké jazero). Minimálny počet taxónov zistených na jednej lokalite (Veľké Dvorníky – Park) bol 1 taxón.

Okrem lokality Liptovský Hrádok (Jazero pod Hradom), kde dominovala podčeľaď Orthocladiinae, všade dominovala podčeľaď Chironominae. Je to veľmi rozsiahla a bohatá skupina, ktorá zahŕňa veľké množstvo druhov s rôznymi životnými cyklami a ekologickými nárokmi, preto nie je prekvapujúca ich rozmanitosť a distribúcia [9]. Ich vysoký podiel mohol zapríčiniť aj fakt, že larvy tejto podčeľade obsahujú hemoglobín (a teda aktívne viažu kyslík), resp. majú iné adaptácie (napr. diapauzujú alebo aktívne čerpajú vodu z vrstiev s vyšším množstvom kyslíka atď.) čo im umožňuje prežiť v prostredí s menej priaznivými podmienkami [10]. Urbánne pondy patria medzi biotopy, v ktorých sú nepriaznivé podmienky časté, keďže kvôli malému objemu vody dochádza k častým a výrazným osciláciam teploty, kyslíkových pomerov a koncentrácií chemických látok vo vode. Z 20 taxónov podčeľade Chironominae patrili do tribu Tanytarsini len 3 taxóny. Ich menej početný výskyt je pravdepodobne zapríčinený tým, že larvy tohto tribu sú citlivejšie na kyslíkové podmienky, ako larvy tribu Chironomini [11], ktoré dominovali v študovaných pondoch.



Obr. 2 Zastúpenie taxonomických skupín z hľadiska počtu druhov.

Larvy druhov podčeľade Orthocladiinae sa nachádzali na 13 lokalitách. Larvy Orthocladiinae uprednostňujú studené vody vo vyššie položených lokalitách a zvyčajne patria medzi tzv. oxy-konformery (oxy-conformers), teda nie sú schopné regulovať spotrebu kyslíka [12], ako to bolo napr. u Chironomini. Preto, zástupcovia Orthocladiinae sú vo všeobecnosti obmedzené na studené a čisté vody s vysokým obsahom kyslíka [12]. Najviac taxónov (5) z danej podčeľade sa nachádzalo práve vo vyššie spomínanom ponde Liptovský Hrádok (Jazero pod Hradom), kde bol nameraný vysoký obsah kyslíka: 10mg.L^{-1}.

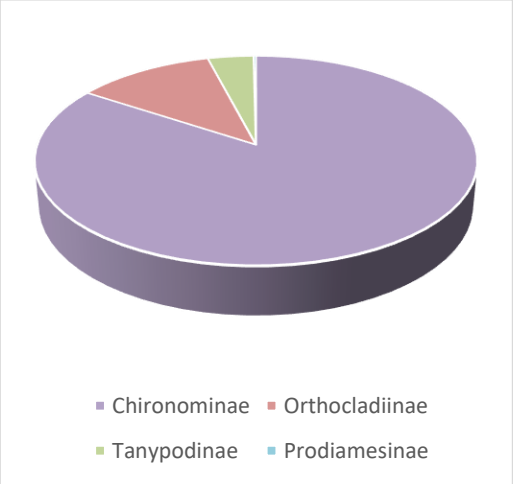
Zástupcovia podčeľade Tanypodinae sa vyskytovali na 9 lokalitách. Larvy sa radia medzi predátorov, živia sa v prvom rade inými živočíchmi, hlavne máloštetinavcami (Oligochaeta) a inými pakomármi. Ich bežný výskyt v skúmaných urbánnych pondoch môže byť vysvetlený okrem množstva dostupnej potravy prítomnosťou makrofytov, ktoré im slúžia ako úkryt [13].

Podčeľaď Prodiamesinae bol zaznamenaný na dvoch lokalitách v karpatskom ekoregióne . Druhy tejto podčeľade vyhľadávajú chladné vody bohaté na kyslík, podobne ako Orthocladiinae.

Medzi najčastejšie sa vyskytujúce taxóny patrili *Glyptotendipes* spp. a *Cricotopus sylvestris* gr.. Každý z nich sa nachádzal na 63 % lokalít (10/16). Larvy *Glyptotendipes* spp. sa zvyčajne vyskytujú v eutrofných vodách, kde ich môžeme nájsť okrem bentosu aj na rastlinách, či rozkladajúcom sa dreve. Často sa objavujú v eutrofných rybníkoch a jazier v blízkosti ľudských obydlí [14]. Larvy *Cricotopus sylvestris* gr. môžeme nachádzať v rozmanitom vodnom prostredí. Často sú asociované s makrofytmi, ktoré využívajú ako pevný substrát, z ktorého spásajú perifytón. Ako ďalšie časté taxóny môžeme uviesť *Chironomus plumosus* gr. a *Tanytarsus* spp. s 50 % zastúpením. Oba taxóny sa vyznačujú širokou ekologickou valenciou, čo znamená, že sú schopné prispôsobiť sa aj menej priaznivým podmienkam prostredia [11]. Niektorí zástupcovia rodu *Tanytarsus* sú dokonca morské [15]. Frekventovaným druhom bol aj *Polypedilum* cf. *nubeculosum* s výskytom v 44 % sledovaných pondov. Larvy patria medzi najhojnejšie bezstavovce v eutrofných rybníkoch. Môžu dosahovať hustotu až 1200 lariev na meter štvorcový [16]. Zastúpenie ostatných druhov je zobrazené v prílohe č. 1, pričom v nej nie sú zahrnuté taxóny vyskytujúce sa iba na jednej lokalite. Zoznam všetkých taxónov vyskytujúcich sa na skúmaných lokalitách uvádza príloha č. 2.

Z hľadiska abundancie tiež dominovala podčeľad Chironominae, zachytených bolo 1637 jedincov, čo predstavuje 84,3 % celkového počtu jedincov. Druhá najpočetnejšia podčeľaď bola Orthocladiinae s počtom

jedincov 227, čo predstavuje 11,7 % celkového počtu zaznamenaných jedincov. Počet jedincov 75 (0,4 %) predstavovala podčeľaď Tanypodinae a najmenej zastúpenou podčeľaďou bola Prodiamesinae (4 jedince) s percentuálnym podielom 0,02 % (Obr. 3). Ide však o malú podčeľaď s malým počtom druhov, ktoré v hydrobiologických vzorkách nikdy nedominujú. Najväčšiu abundanciu (412 jedincov) sme zaznamenali v Lučenci (Rapovce), naopak najmenšiu (1 jedinec) v ponde Veľké Dvorníky - Park. Celkovo najviac jedincov z podčeľade Chironominae patrilo už spomínaným taxónom *Glyptotendipes* spp. (652), z podčeľade Orthocladiinae *Cricotopus sylvestris* gr. (145) a z podčeľade Tanypodinae *Procladius* spp. (62). *Procladius* spp. podobne ako *Chironomus* spp. sa často nachádza v eutrofných jazerách, ktoré sú bohaté na živiny a tým pádom v nich často dochádza k anoxii (nedostatku kyslíka) počas veľkej časti leta môžu byť larvy *Procladius* a *Chironomus* jedinými zástupcami hmyzu [17].



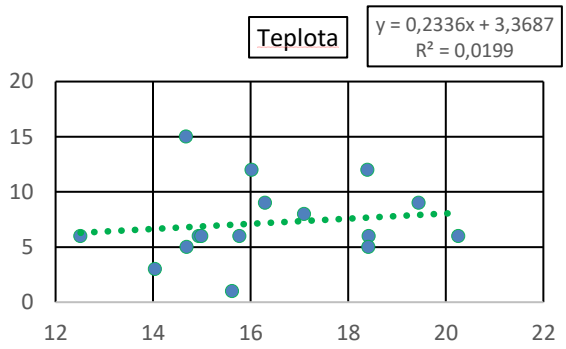
Obr. 3 Zastúpenie taxonomických skupín z hľadiska počtu jedincov.

Medzi zaujímavé faunistické nálezy patrí *Chironomus muratensis*, ktorý je prvým nálezom na Slovensku. Larvy rodu *Chironomus* sú celkovo náročné pre identifikáciu. Aj *Chironomus*. *muratensis* sa v 90. rokoch 20. storočia často zamieňal s druhom *C. balatonicus* Dévai, Wuelker and Scholl, 1983, a opačne, z dôvodu veľkej morfologickej podobnosti. Okrem toho sa oba druhy môžu vyskytovať v rovnakých biotopoch. V Holandsku boli nájdené v čističke odpadových vôd [18]. Táto skutočnosť preukazuje ich rozsiahlu škálu tolerancie v nepriaznivých podmienkach prostredia. U nás boli larvy nájdené v Lučenci - Rapovce, kde teplota vody pri odbere v polovici októbra dosahovala 17°C a obsah kyslíka 11 $mg.L^{-1}$.

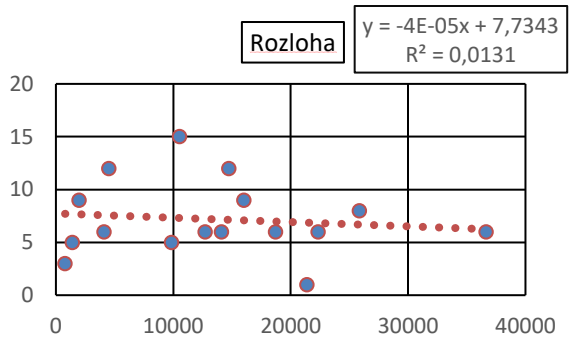
Panónsky aj karpatský ekoregión sú oblasti s bohatou štruktúrou riek a jazier. Oba ekoregióny sa vyznačujú veľkou biodiverzitou a môžeme tu nájsť aj rôzne druhy pakomárov, ktoré sa prispôsobili miestnym podmienkam. Podľa našich zistení na základe skúmaných vzoriek sa v panónskom ekoregióne na najväčšom počte lokalít vyskytovali taxóny ako: *Chironomus plumosus* gr., *Cricotpus sylvestris* gr. a *Glyptotendipes* spp.. Naopak pre karpatský ekoregión sú na základe nami zistených výsledkov typickejšie taxóny ako: *Corynoneura scutellata* gr., *Microtendipes* spp., *Polypedilum* cf. *nubeculosum*, *Procladius* spp., *Tanytarsus* spp. a taktiež *Cricotopus sylvestris* gr.

2.2 Vzťah taxonomickej bohatosti a environmentálnych premenných

V predkladanej práci sme analyzovali vzťah taxonomického bohatstva pakomárov k viacerým charakteristikám daného prostredia na základe meraných environmentálnych faktorov. Všetky korelácie sa ukázali ako štatisticky nepreukázané (Obr.4 a 5).



Obr. 4 Vzťah teploty (x-os) a taxonomickej bohatosti pakomárov (y-os)



Obr. 5 Vzťah rozlohy (x-os) a taxonomickej bohatosti pakomárov (y-os)

Existuje niekoľko dôvodov, prečo nevidíme výraznejšie trendy medzi jednotlivými environmentálnymi premennými a biodiverzitou. Jednotlivé ekologické systémy sú veľmi komplexné a môžu byť ovplyvnené mnohými faktormi. Niektoré vzťahy môžu byť nelineárne, čo znamená, že zmeny medzi environmentálnymi premennými môžu mať rôzne účinky na biodiverzitu v závislosti od ich konkrétnej hodnoty. Dané hodnoty (nadmorská výška, rozloha, hĺbka, pH, teplota, ORP, TDS, salinita, konduktivita) predstavujú bodové merania a teda nezohľadňujú cirkadiánnu alebo ročnú dynamiku premenných. Takisto vyhodnocovanie diverzity bola založená na malom počte lokalít čo môže znížiť schopnosť odhaliť skutočné vzťahy medzi premennými a biodiverzitou. Biodiverzita a hodnoty environmentálnych premenných môžu byť ovplyvnené aj zmenami v čase a priestore, ako napríklad sezónne zmeny ale aj časté oscilácie a tieto faktory môžu zasahovať do korelácie. Preto je dôležité pri interpretácií korelácií zohľadniť jednotlivé faktory.

Záver

Prezentovaná práca sa zaoberá štruktúrou a diverzitou spoločenstiev čeľade pakomárovitých 16 urbánnych pondov na území Slovenska, pričom časť lokalít sa nachádzala v karpatskom a časť v panónskom ekoregióne. Celkovo bolo zachytených 1943 lariev, ktoré boli determinované do 38 taxónov štyroch podčeľadí: Chironominae, Orthocladiinae, Tanypodinae a Prodiamesinae. Najbežnejšou podčeľaďou bola Chironominae, zastúpená 20 taxónmi v 15 pondoch.

Medzi najzaujímavejšie nálezy patrí *Chironomus* cf. *muratensis*, ktorý je prvým nálezom na Slovensku.

Štúdia popisuje charakteristické spoločenstvo pakomárov v tomto prostredí, ktoré zahŕňa taxóny s vysokou ekologickou valenciou, zvyčajne asociované s malými vodnými biotopmi s bohatým rastlinným pokrytím.

V rámci výskumu sme vykonali aj analýzu taxonomického bohatstva ku vzťahu k niektorým environmentálnym premenným prostredia (nadmorská výška, rozloha, pH, konduktivita, teplota a pod.), ale korelácie neboli štatisticky signifikantné. Dôvodom môžu byť malé množstvo analyzovaných vzoriek (pondov), bodové meranie premenných ale aj malý počet odberov biologického materiálu ako aj krátke gradienty environmentálnych premenných.

Pre budúcnosť bude dôležité do analýz zahrnúť viac pondov z viacerých vzorkovaní (jarné, letné a jesenné), ktoré by zachytili reálnu druhovú rozmanitosť pakomárov a rozšíriť gradient environmentálnych premenných.

Poslaním tejto štúdie je rozšíriť naše vedomosti o vplyve urbanizácie na vodné ekosystémy a ich biodiverzitu, a tým poskytnúť základ pre efektívnejšie environmentálne plánovanie a ochranu vodných zdrojov. Taktiež zdôrazňuje potrebu ďalších štúdií, aby sme lepšie pochopili a spravovali tieto dôležité ekosystémy.

Poďakovanie

Touto cestou by som sa chcela poďakovať prof. Ing. Ladislavovi Hamerlíkovi, PhD., za poskytnutie cenných informácií, za jeho čas, ochotu, trpezlivosť a pomoc pri determinácií biologického materiálu, odborné rady, pripomienky a povzbudenie. Prof. RNDr. Petrovi Bitušíkovi, CSc., za jeho odborné rady a pomoc pri determinácií biologického materiálu. A v neposlednom rade Mgr. Igorovi Kokavcovi za jeho odborné rady. Práca je podporovaná projektom VEGA 2/0044/22.

Použitá literatúra

[1] SCHUELER, T. a SIMPSON, J., 2001: Introduction: Why urban lakes are different, Watershed Protection Techniques, 3: 747.

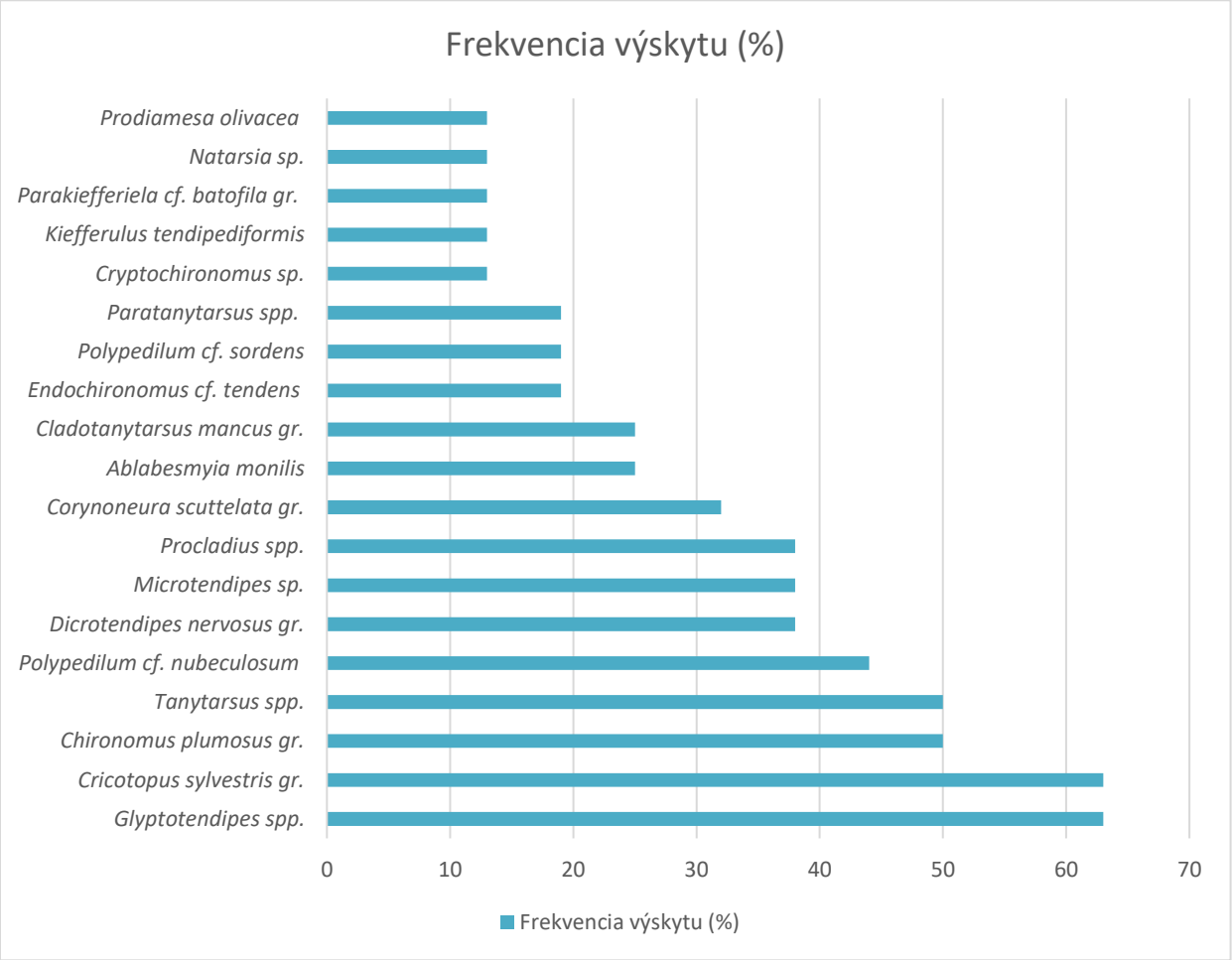
[2] WILLIAMS, P., WHITFIELD, M., BIGGS, J., BRAY, S., FOX, G., NICOLET, P., SEAR, D., 2004: Comparative biodiversity of rivers, streams, ditches and ponds in an agricultural landscape in Southern England. Biol. Conserv., 115: 329-341.

[3] BITUŠÍK, P., 2000: Príručka na určovanie lariev pakomárov (Diptera: Chironomidae) Slovenska. Časť I. Technická univerzita vo Zvolene, Zvolen.

[4] ARMITAGE, P.D., CRANSTON, P.S., PINDER, L.C.V (eds) 1995: The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges. CHAMPAN and HALL, London.
[5] SAETHER, O.A., 2000: Phylogeny of the subfamilies of Chironomidae (Diptera). Systematic Entomology, 25 (3): 393-403.
[6] ANDERSEN, T., SAETHER, O.A., CRANSTON, P.S. a EPLER, J.H., 2013: The larvae of Orthocladiinae (Diptera: Chironomidae) of the Holarctic region-Keys and diagnoses. *Insect Systematics and Evolution*. Entomological Society of Lund, Sweden. 66: 189-385.
[7] BITUŠÍK, P. a HAMERLÍK, L., 2014: Príručka na určovanie lariev pakomárov (Diptera: Chironomidae) Slovenska *Časť 2. Tanypodinae.* Vydavateľstvo Univerzity Mateja Bela v Banskej Bystrici- Belanium, Fakulta prírodných vied, Banská Bystrica.
[8] VALLENDUUK, H.J., 2019: Lauterbornia: Internationale Zeitschrift fur Faunistik und Floristik der Binnengewasser Europas. Dinkelscherben: Erik Mauch Verlag, Germany.
[9] LANGTON, P.H., 1991: A key to pupal exuviae of West Palaearctic Chironomidae. Privately published, 386 p.
[10] NAGELL, B., LANDAHL, C.C., 1978: Resistance to anoxia of Chironomus plumosus and Chironomus anthracinus (Dipetra) larvae. Holarctic Ecology, 333: 33.
[11] KUBOVČÍK, V., 2013: subfosilné spoločenstvá pakomárovitých (Diptera: Chironomidae) ako indikátory historických zmien prostredia. Technická univerzita vo Zvolene, Zvolen, 103: 15-20.
[12] BRODERSEN, K., PEDERSEN, P., OJ LINDEGAARD, C. and HAMBURGER, K., 2004: Chironomids (Diptera) and oxy-regulatory capacity: An experimental approach to paleolimnological interpretation. Limnology and Oceanography, 49: 1549-1559.
[13] BAKER, A. S., MCLACHLAN, A.J., 1979: Food preferences of Tanypodinae larvae (Diptera: Chironomidae). Hydrobiologia, 62 (3): 283-288.
[14] EPLER, J.H., 2001: Identification manual for the larvaL chironomidae (Diptera) of North and South Carolina. North Carolina Department of Environmental and Natural Resources, Raleigh, NC.
[15] NA., K.B., BAE, Y.J., 2010: New species of Ctictochironomus, Tanytarsus and Conchapelopia (Diptera: Chironomidae) from Korea. Entomological Research Bulletin, 26: 33-39.
[16] INT PANIS, L., BERVOETS, L., VERHEYEN, R.F., 1995: The spatial distribution of Caenis horaria (L., 1758) (Caenidae, Ephemeroptera) in a pond in Niel (Belgium). Bull. Ann. Soc. R. Ent., Belgium, 131: 47-51.
[17] HILSENHOFF, W.L., 1966: The biology of Chironomus plumosus (Diptera: Chironomidae) in Lake Winnebago, Wisconsin. Annals of the Entomological Society of America, 59 (3): 465-473.
[18] VELDEN, J.A., VAN DER, H.K.M., MOLLER PILLOT, H.J., VALLENDUUK and WIERSMA, S.M., 1996: The occurance of Chironomus balatonicus (Diptera: Chironomidae) in the Netherlands. Ent. Ber., Amsterdam, 56 (1): 14-15.

Prílohy

Príloha č.1 Frekvencia výskytu jednotlivých taxónov na lokalitách (%). Taxóny vyskytujúce sa iba na jeden lokalite neboli zahrnuté do grafu.



Príloha č.2 Zoznam všetkých zaznamenaných taxónov počas výskumu

Ablabesmyia monilis (Linnaeus, 1758)
Chironomus muratensis (Ryser, Scholl & Wuelker, 1983)
Chironomus plumosus gr.
Cladopelma cf. *viridulum* (Linnaeus, 1767)
Cladotanytarsus mancus gr.
Clinotanipus nervosus (Meigen, 1818)
Corynoneura scutellata gr.
Cricotopus cf. *cylindraceus* (Kieffer, 1908)
Cricotopus intersectus gr.
Cryptochironomus spp.
Cricotopus patens/flavocinctus (Kieffer, 1924*)*
Cricotopus pilitarsis aggreg.
Cricotopus sylvestris gr.
Dicrotendipes nervosus gr.
Endochironomus albipennis (Meigen, 1830)
Endochironomus cf. *tendens* (Fabricius, 1775)
Glyptotendipes spp.
Hydrobaenus lububris gr.
Kiefferulus tendipediformis (Goetghebuer, 1921)
Limnophyes sp.
Macropelopia sp.
Microchironomus spp.
Microtendipes spp.
Monopelopia tenuicalcar (Kieffer, 1918)
Natarsia sp.
Parakiefferiela batophila gr.
Paratanytarsus spp.
Phaenopsectra cf. *flavipes* (Meigen, 1818)
Polypedilum cf. *nubeculosum* (Meigen, 1804)
Polypedilum cf. *sordens* (Wulp, 1875)
Procladius spp.
Prodiamesa olivacea (Meigen, 1818)
Psectrocladius sordidellus gr.
Rheocricotopus atripes/effusus (Kieffer, 1913/ Walker, 1856)
Stictochironomus cf. *pictulus* (Meigen, 1830)
Stictochironomus sticticus aggreg.
Tanytarsus spp.
Zavrelimyia sp.

Anatomické a fyziologické aspekty v odpovedi rastlín slnečnice na abiotický stres

Anatomical and physiological aspects in response of sunflower plants to abiotic stress

Viktória Borguľová[1]
Školiteľ: Roman Kuna[1]
[1]Katedra botaniky a genetiky, FPVaI UKF, Nábrežie mládeže 91, 949 01 Nitra
viktoria.borgulova@student.ukf.sk, rkuna@ukf.sk

Abstrakt
V práci sme sa zamerali na hodnotenie vplyvu kadmia pri koncentráciách 1 mg/l a 3 mg/l Cd v substráte na rastliny slnečnice. Po 3 týždňoch kultivácie sme odobrali vzorky listov a koreňov, ktoré sme použili na stanovenie indikátorov oxidačného stresu.

Štatisticky významné rozdiely sme zaznamenali hlavne v miere bunkovej smrti a peroxidácii lipidov listov aj koreňov, kde sme zaznamenali zvýšenie v meraných indikátoroch so zvýšením koncentrácie Cd. Zároveň sme zaznamenali, že koncentrácia 3 mg/l Cd mala výrazne negatívny vplyv na celkovú veľkosť listovej plochy, koncentráciu H_2O_2, mieru bunkovej smrti v listoch a peroxidáciu lipidov vo vzorkách listov a koreňov.

Výsledky poukazujú na vysokú citlivosť rastlín na nepatrné zmeny koncentrácie Cd v substráte, pričom hlavný faktor zohráva pestovanie v hydropónii, v porovnaní s pôdou, kde sa ani mnohonásobne vyššie zmeny v koncentrácii Cd nemusia prejaviť s významným rozdielom.

Kľúčové slová: kadmium, *Helianthus annuus*, oxidačný stres, hydropónia

Abstract
In this work we focused on evaluating the impact of cadmium, at concentrations of 1 mg/l and 3 mg/l Cd in substrate on sunflower plants. After 3 weeks of cultivation we took samples of leaves and roots, which were used to determine several indicators of oxidative stress.

Statistically significant differences were noted mainly in rates of cell death and peroxidation of lipids in both leaves and roots, where we noted increase in measured indicators with increase in cadmium concentration. At the same time, we noted significantly negative impact of Cd concentration at 3 mg/l on the total size of leaf area, H_2O_2 concentration, the rate of cell death in leaves and peroxidation of lipids in leaves and roots.

The results show high sensitivity of plants to small changes in the concentration of Cd in substrate, where the main factor is cultivation in hydroponics, compared to soil, where much higher changes in Cd concentration may not manifest with significant difference.

Key Words: cadmium, *Helianthus annuus*, oxidative stress, hydroponic

Úvod

Z globálneho hľadiska neustále narastá riziko vyplývajúce zo znečistenia prostredia ťažkými kovmi. Kadmium (Cd) je neesenciálny ťažký kov toxický pre rastliny a živočíchy, pričom táto toxicita sa prejavuje už pri veľmi nízkych koncentráciách [1]. V prostredí sa vyskytuje prirodzene v malých množstvách ako súčasť rúd, ale jeho hladiny sú zvyšované antropogénnou činnosťou ako ťažba, tvorba skládok, kovový priemysel, emisie a používanie fosfátových hnojív. Za toxickú koncentráciu kadmia v pôde sa udáva 5 mg/kg [2].

Rastliny vykazujú vysokú schopnosť akumulovať kadmium vo svojich pletivách. Menšiu časť Cd prijímajú rastliny z atmosféry cez listy, ale väčšina je absorbovaná koreňovou sústavou, odkiaľ je následne prenášané do celej rastliny. Na absorpcii kadmia sa podieľajú transportéry zodpovedné za príjem iónov Ca^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+} a Zn^{2+}[3]. Toxické účinky spôsobené akumuláciou Cd v rastlinách zahŕňajú narušenú tvorbu chlorofylov a karotenoidov, zníženú aktivitu fotosyntetických enzýmov, produkciu reaktívnych foriem kyslíka (ROS), zmenu štruktúry chloroplastov a morfologické zmeny na orgánoch ako zakrpatenie, vysychanie, chlorózy a nekrózy [4].

Tvorba ROS po chemickej alebo fyzikálnej aktivácii kyslíka je v rastlinách následok nielen pôsobenia abiotických a biotických stresových faktorov, ale aj fyziologických dejov, ktoré sú pre rastlinu nevyhnutné. Oxidačný stres nastáva v prípade, kedy je rovnováha

medzi tvorbou a elimináciou ROS narušená. Toxický účinok Cd sa prejavuje práve narušením tejto rovnováhy zvýšením tvorby ROS a zvýšením oxidačného stresu. V dôsledku zvýšenej hladiny ROS dochádza k peroxidácii membránových lipidov, čoho priamym indikátorom je malondialdehyd (MDA), jeden z konečných produktov tohto procesu. Zmeny v membránach vyvolané v dôsledku ROS ovplyvňujú ich priepustnosť a celkovú stabilitu, čo vedie k bunkovej smrti [4].

Medzi najvýznamnejšie ROS zaraďujeme superoxidový aniónový radikál (superoxid, $O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál ($OH^{\cdot}$), singletový kyslík ($^1O_2$) a peroxid vodíka (H_2O_2). Miesta ich produkcie zahŕňajú chloroplasty, mitochondrie, peroxizómy, plazmatické membrány, endoplazmatické retikulum a bunkové steny [5].

H_2O_2 je v rámci ROS najstabilnejšia molekula s hlavnými miestami vzniku najmä v chloroplastoch a mitochondriách . V rastlinných bunkách je cez membrány transportovaný akvaporínmi, čo mu umožňuje rýchle šírenie v pletivách a vyvolanie oxidačného stresu vo vzdialenejších miestach. Zároveň je táto vlastnosť využívaná v roli H_2O_2 ako regulátora bunkovej signalizácie. Zúčastňuje sa významných procesov ako sú senescencia, formovanie bunkovej steny a diferenciácia buniek. Na jeho odstránení z buniek a pletív sa zúčastňujú kataláza, glutatiónperoxidáza a askorbátperoxidáza [5].

Rozlišujeme 3 kategórie rastlín podľa ich reakcie na toxicitu kovov. Indikátory sú rastliny bez prostriedkov na vysporiadanie sa s kovmi, a tak akumulujú zvyšujúce sa koncentrácie kovových iónov priamo úmerne so zvyšujúcou sa koncentráciou kovov v pôde. Exklúdery aktívne odstraňujú zo svojich pletív prebytočné kovové ióny, čoho následkom je konštantná koncentrácia kovu v pletivách rastlín rastúcich v širokom spektre obsahu kovov v pôde. Akumulátory alebo hyperakumulátory aktívne akumulujú kovy vo svojich pletivách, s najvyššími bioakumulačnými koeficientmi pri najnižších pôdnych koncentráciách kovu, s čiastočnou saturáciou pri vyšších pôdnych koncentráciách [6]. Medzi hyperakumulátory zaraďujeme druhy ako *Thlaspi caerulescens* (Zn, Cd), *Brassica juncea* (Pb, Zn, Se, Cr), *Armeria maritima* (Zn, Pb) a *Helianthus annuus* (Cd, Pb, Zn) [7].

Slnečnica ročná (*Helianthus annuus*) je poľnohospodársky významná plodina, patriaca do čeľade *Asteraceae*, pôvodom zo Severnej Ameriky. Jej schopnosť hyperakumulácie Cd a iných kovov z pôd predstavuje riziko z hľadiska vstupu ťažkých kovov do potravinového reťazca. Zároveň sa v posledných dekádach výskumy začali zameriavať na jej remediačný potenciál pri fytoextrakcii ťažkých kovov z pôd. Jej vysoká odolnosť proti stresu vyvolanom ťažkými kovmi, skombinovaná so schopnosťou akumulovať relatívne veľké množstvá kovových iónov a vysokou produkciou biomasy, sú zodpovedné za jej vhodnosť pre extrakciu kadmia, olova a zinku z pôdy [8].

1 Pestovanie, odber a analýza rastlinného materiálu

Semená slnečnice (*Helianthus annus*, hybrid P64HE118), sme nechali imbibovať v kadičke s destilovanou vodou pri teplote 24 °C po dobu dvoch hodín. Po imbibícii sme semená nechali klíčiť v papierových rolkách v kadičke s destilovanou vodou pri teplote 24 °C. Po 3 dňoch klíčenia sme do tmavých nádob s Hoaglandovým živným roztokov [9] presunuli 10 vhodných klíčnych rastlín na každú z koncentrácií. Kontrola obsahovala samostatný Hoaglandov živný roztok s objemom 3 l, do ostatných nádob sme pridali kadmium vo forme $CdCl_2$ v koncentráciách 1 a 3 mg/l Cd^{2+}. Živné roztoky boli počas kultivácie prevzdušňované. Rastliny sme kultivovali hydroponicky v klimaboxe pri teplote 25 °C, fotoperióde 12h/12h po dobu troch týždňov. Na spektrofotometrické stanovenie bunkovej smrti sme odobrali vzorky z tretích listov a koreňov, na stanovenie obsahu H_2O_2 z druhých listov a koreňov, a na stanovenie peroxidácie lipidov z prvých listov a koreňov. Na histochemické stanovenie prítomnosti H_2O_2 sme odobrali tretie listy.

1.1 *In situ* lokalizácia H_2O_2

Na zhodnotenie tvorby H_2O_2 „*in situ*" farbením sme použili 3,3'-diaminobenzidín (DAB) podľa metodiky Kumar, 2014 [10]. Tretie listy sme celé ponorili do roztoku DAB s koncentráciou 1 mg/ml, pH 3,8. Činidlo sme infiltrovali pri tlaku 18 kPa, po dobu 3 min a následne sme vzorky inkubovali pri izbovej teplote 2-3 hod na svetle. Chlorofyl sme z listov odstránili zahrievaním vo vriacom etanole a zafarbené listy sme odfotografovali. Výskyt zafarbenia sme kvantifikovali pomocou analýzy obrazu použitím softvéru ImageJ2/Fiji v 1.54h.

1.2 Stanovenie bunkovej smrti

Životaschopnosť rastlinných buniek sme merali na základe absorpcie činidla – Evansova modrá (EB – Evans blue). Použili sme upravenú metodiku Vijayaraghavareddy, 2017 [11]. Vzorky listov a koreňov (1,5 g) sme inkubovali v 0,25 % vodnom roztoku EB po

dobu 20 min pri izbovej teplote. Po inkubácii sme vzorky premývali destilovanou vodou po dobu minimálne 2 x 15 min na odstránenie nadbytočného farbiva. Vzorky listov sme dodatočne niekoľko min odfarbovali vo vriacom etanole. Následne sme vzorky inkubovali v 10 ml 1 % (w/v) roztoku SDS v 50 % metanole pri teplote 50 °C po dobu 15 min. Po inkubácii sme vzorky homogenizovali v mažiari použitím 1,5 ml 1 % (w/v) roztoku SDS v 50 % metanole. Následne sme homogenát centrifugovali pri 14 000 g počas 15 min. Absorbanciu supernatantu sme merali spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 600 nm. Výsledné absorbancie sme prepočítali podľa rovnice:

$$x = \frac{y + 0{,}057}{0{,}002} \qquad (1), [12]$$

1.3 Stanovenie obsahu H_2O_2

Obsah H_2O_2 sme stanovili podľa metódy Velikova, 2000 [13]. Vzorky listov a koreňov (0,2 g) sme homogenizovali s 2 ml 0,1 % TCA v predchladenom mažiari na ľade. Homogenát sme centrifugovali pri 12 000 g počas 15 min pri 4 °C. Reakčná zmes pozostávala z 0,5 ml supernatantu, 0,5 ml 10 mM fosfátového pufru a 1 ml 1 M KI. Absorbanciu supernatantu sme merali spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 390 nm. Výsledné absorbancie sme prepočítali podľa rovnice:

$$x = 1000y - 28 \qquad (2), [14]$$

1.4 Stanovenie peroxidácie lipidov

Peroxidáciu lipidov sme merali ako obsah malondialdehydu (MDA) podľa metodiky Zhou a Leul, 1999 [15]. Vzorky listov a koreňov (0,2 g) sme homogenizovali v 10 ml zmesi 0,25 % TBA v 10 % TCA. Homogenát sme zahrievali na 95 °C počas 30 min, následne ho prudko schladili na ľade. Potom sme ho centrifugovali pri 5000 g počas 10 min. Absorbanciu supernatantu sme merali spektrofotometricky pri vlnových dĺžkach 532 nm a 600 nm. Výsledné absorbancie sme prepočítali podľa rovnice:

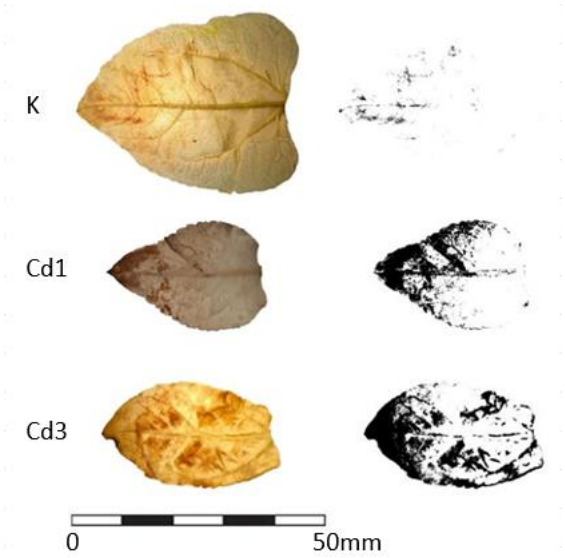
$$x = \frac{y + 0{,}0011}{0{,}0202} \qquad (3), [14]$$

2 Výsledky a diskusia

Zvolený rastlinný materiál sme pestovali po dobu troch týždňov, po ktorých vzorky listov a koreňov na stanovenie indikátorov oxidačného stresu. Namerané hodnoty absorbancií pri spektrofotometrickom stanovovaní sme prepočítali pomocou kalibračných kriviek, stanovili sme hodnoty koncentrácií látok a vyhodnotili sme ich štatistickými nástrojmi MS Excel. Pri histochemickom stanovení H_2O_2 sme výskyt zafarbenia kvantifikovali pomocou analýzy obrazu s použitím softvéru ImageJ2/Fiji.

2.1 *In situ* lokalizácia H_2O_2

Peroxid vodíka je jedným z hlavných typov ROS. Je využívaný ako signálna molekula pri viacerých procesoch, medzi nimi aj spúšťanie stresovej reakcie. Koncentrácia H_2O_2 musí byť úzko regulovaná, pretože pri vzniku nerovnováhy v jeho tvorbe a rozpade začne prevažovať jeho toxický efekt na bunky. Prítomnosť H_2O_2 sme detegovali histochemicky pomocou DAB, ktorého reakcia s endogénnym H_2O_2 je vizualizovaná ako červenohnedé zafarbenie. Na stanovenie sme použili tretie listy.



Obr. 1 Tretie listy kontrolnej rastliny, s koncentráciou 1 mg/l Cd a 3 mg/l Cd (vľavo), výsledná zafarbená plocha upravená softvérom Fiji (vpravo)

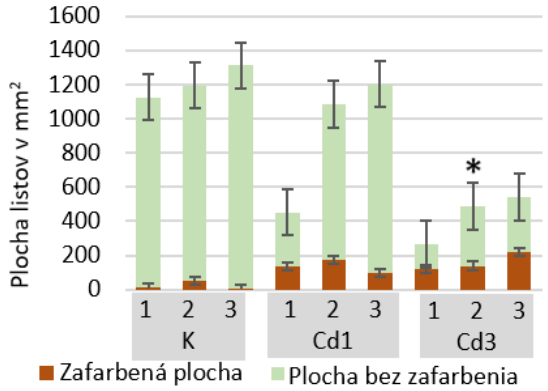
Na obrázku 1 pozorujeme nárast zafarbenej plochy na listoch vystavených kadmiu oproti kontrole. Pri vizuálnom vyhodnotení listy kontrolnej vzorky vykazovali minimálne zafarbenie sústredené prevažne v blízkosti špičky listov. Pri vzorkách listov vystavených 1 mg/l Cd pozorujeme súvislejšie plochy zafarbenia,

sústredené do oblasti špičky a okrajov čepele. Vzorky listov vystavených 3 mg/l Cd vykazujú lokalizáciu rozsiahlych ložísk po celej oblasti čepele.

Tab. 1 Výsledné priemerné hodnoty celkovej plochy listov a % zafarbenej plochy kontrolných rastlín, s koncentráciou 1 mg/l Cd a 3 mg/l Cd v substráte, získané pomocou softvéru Fiji

	Celková plocha	% plochy
Kontrola	1211 mm^2	1,88 %
1 mg/l Cd	912,37 mm^2	14,86 %
3 mg/l Cd	431,3 mm^2	36,89 %

Spracované výsledné hodnoty znázornené v tabuľke 1 boli získané z priemerov vzoriek troch listov. Priemerné hodnoty celkovej plochy listov by nasvedčovali postupnému zmenšovaniu plochy čepele, so súčasným zvyšovaním % zafarbenej plochy. V porovnaní s priemernou plochou 1211 mm^2 kontroly, listy rastlín vystavené pôsobeniu 1 mg/l Cd a 3 mg/l Cd mali v priemere zmenšenú plochu o 24,7 % a 64,4 %. Štatisticky významný rozdiel sme zaznamenali pri porovnaní kontrolných vzoriek a vzoriek vystavených 3 mg/l Cd, a to pri rozdiele celkových plôch čepele a % zafarbených plôch, kedy priemer kadmiových vzoriek dosiahol 36,89 % v porovnaní s kontrolnými 1,88 %. Štatisticky významné bolo aj % zafarbenej plochy rastlín vystavených 1 mg/l Cd, v porovnaní s kontrolnými vzorkami.



Graf 1 Porovnanie celkovej plochy tretích listov kontrolných rastlín (K 1-3), s koncentráciou 1 mg/l Cd (Cd1 1-3) a 3 mg/l Cd (Cd3 1-3) v substráte. Znázornené sú chybové úsečky štandardnej chyby priemeru a významnosť (priemer troch listov) pri $p < 0,05$ (*) v rámci dvojvýberového t-testu s nerovnosťou rozptylu

Pri porovnaní všetkých vzoriek pozorujeme pri listoch rastlín vystavených 1 mg/l Cd zmenšenie plochy čepele len v jednom prípade s veľkosťou 451,6 mm^2, kedy je táto hodnota porovnateľná s priemerom 431,3 mm^2 listov vystavených pôsobeniu 3 mg/l Cd. Hodnoty zvyšných 2 listov - 1083,8 mm^2 a 1201,6 mm^2 - sú porovnateľné s priemernou hodnotou 1211 mm^2 kontroly. Pozorujeme najskôr nárast % zafarbenej plochy pri listoch rastlín vystavených 1 mg/l Cd, s následným zmenšením celkovej plochy pri listoch rastlín vystavených 3 mg/l Cd so zanedbateľným rozdielom vo veľkosti zafarbenej plochy v porovnaní s 1 mg/l Cd.

2.2 Stanovenie bunkovej smrti

Rastliny vystavené ťažkým kovom produkujú ROS, ktoré následne poškodzujú integritu membrán a spôsobujú bunkovú smrť. Vlastnosť farbiva EB prenikať len do buniek s poškodenou membránou sme využili pri posudzovaní miery životaschopnosti buniek rastlín vystaveným pôsobeniu kadmia. Výsledné hodnoty znázornené v tabuľke 2 a grafe 2 sme získali z priemerov troch vzoriek.

Tab. 2 Výsledné hodnoty obsahu EB v ng/g čerstvej hmotnosti v listoch a koreňoch kontrolných rastlín, s koncentráciou 1 mg/l Cd a 3 mg/l Cd v substráte

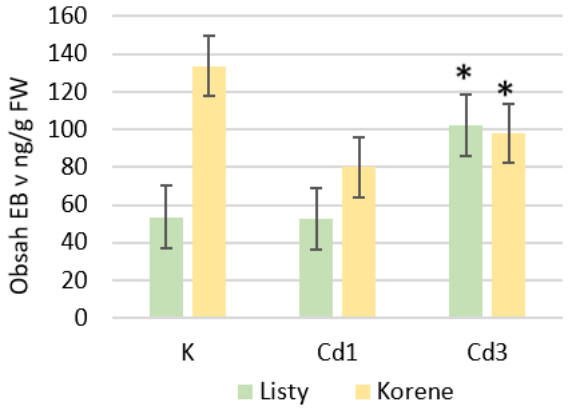
	Obsah EB (listy)	Obsah EB (korene)
Kontrola	53,56 ng	133,56 ng
1 mg/l Cd	52,44 ng	79,89 ng
3 mg/l Cd	102,33 ng	97,89 ng

Vo vzorkách listov sme najnižší obsah EB zaznamenali pri vzorkách z kontrolných rastlín, aj pri rastlinách vystavených pôsobeniu 1 mg/l Cd, a to 53,56 ng/g a 52,44 ng/g. Z týchto hodnôt by sme mohli usúdiť, že vystavenie rastlín pôsobeniu 1 mg/l Cd v substráte, nemalo vplyv na zníženie životaschopnosti buniek listov. Štatisticky významný rozdiel sme zaznamenali pri porovnaní so vzorkami z rastlín vystavených 3 mg/l Cd v substráte, kedy v porovnaní s kontrolou môžeme sledovať 91 % nárast absorbovaného farbiva.

Naopak najvyšší obsah EB v koreňoch sme zaznamenali v kontrolných vzorkách s hodnotou 133,56 ng/g. V porovnaní, vzorky vystavené pôsobeniu 1 mg/l Cd a 3 mg/l Cd v substráte, mali obsah farbiva znížený o 40,2 % a 26,7 %.

Štatisticky významné rozdiely sme zaznamenali pri porovnaní vzoriek vystavených kadmiu. Vo vzorkách listov rastlín vystavených 3 mg/l Cd sme zistili 95 % nárast obsahu EB, v porovnaní so vzorkami rastlín

vystavených koncentrácii 1 mg/l Cd. Zároveň sme pri vzorkách koreňov týchto rastlín pozorovali 22 % nárast obsahu EB so zvýšením koncentrácie Cd. Tieto výsledky poukazujú na zvýšenie miery poškodenia buniek so zvýšením koncentrácie Cd.



Graf 2 Výsledné hodnoty obsahu EB v ng/g čerstvej hmotnosti listov a koreňov kontrolných rastlín, s koncentráciou 1 mg/l Cd a 3 mg/l Cd v substráte. Znázornené sú chybové úsečky štandardnej chyby priemeru a významnosť pri $p < 0,05$ (*) v rámci dvojvýberového t-testu s nerovnosťou rozptylu

Kým v listoch môžeme konštatovať zvyšujúcu sa mieru poškodenia buniek so zvyšovaním koncentrácie Cd, abnormálne vysoké hodnoty obsahu EB v koreňoch kontrolných vzoriek nám nepotvrdzujú zvýšenie miery poškodenia buniek v koreňoch rastlín pestovaných v substráte s pridaným Cd.

2.3 Stanovenie obsahu H_2O_2

Obsah H_2O_2 sme stanovili spektrofotometricky, použitím metodiky Velikova, 2000. Výsledné hodnoty znázornené v tabuľke 3 a grafe 3 sme získali z priemerov troch vzoriek.

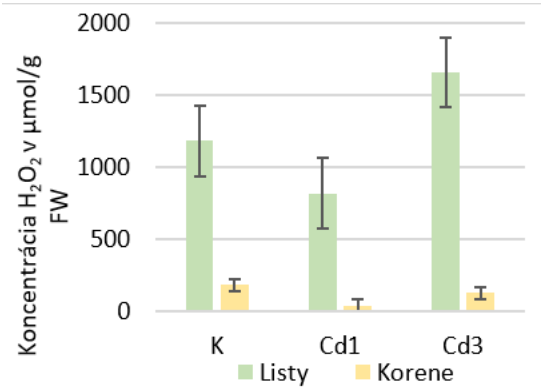
Tab. 3 Výsledné hodnoty koncentrácie H_2O_2 v µmol/g čerstvej hmotnosti v listoch a koreňoch kontrolnej rastliny, s koncentráciou 1 mg/l Cd a 3 mg/l Cd v substráte

	Koncentrácia H_2O_2 (list)	**Koncentrácia H_2O_2 (koreň)**
Kontrola	1183 µmol	182 µmol
Cd 1 mg/l	820 µmol	40 µmol
Cd 3 mg/l	1658 µmol	127 µmol

Najvyššie hodnoty sme namerali v listoch rastlín vystavených pôsobeniu 3 mg/l Cd v substráte. V porovnaní s kontrolnými vzorkami, koncentrácia H_2O_2 sa zvýšila o 40,1 %. Naopak pri rastlinách vystavených 1 mg/l Cd v substráte je koncentrácia znížená o 30,7 % v porovnaní so vzorkami kontrolných rastlín.

Najvyššie koncentrácie H_2O_2 v koreňoch sme zaznamenali vo vzorkách koreňov kontrolných rastlín, s priemernou hodnotou 181,7 µmol/g. Vo vzorkách koreňov rastlín vystavených 1 mg/l Cd a 3 mg/l Cd boli hodnoty koncentrácie H_2O_2 znížené o 78 % a 30,3 %.

Pri porovnaní vzoriek listov a koreňov vystavených pôsobeniu Cd pozorujeme nárast koncentrácie H_2O_2 so zvýšením koncentrácie Cd. Vo vzorkách listov rastlín vystavených pôsobeniu 3 mg/l Cd v substráte sme zaznamenali 2-násobný nárast koncentrácie H_2O_2 v porovnaní so vzorkami listov rastlín vystavených len 1 mg/l Cd v substráte. Nárast koncentrácie H_2O_2 vo vzorkách koreňov rastlín vystavených 3 mg/l Cd bol až 3-násobný v porovnaní so vzorkami vystavenými 1 mg/l Cd.



Graf 3 Výsledné hodnoty koncentrácie H_2O_2 v µmol/g čerstvej hmotnosti listov a koreňov kontrolných rastlín, s koncentráciou 1 mg/l Cd a 3 mg/l Cd v substráte. Znázornené sú chybové úsečky štandardnej chyby priemeru a významnosť pri $p < 0,05$ (*) v rámci dvojvýberového t-testu s nerovnosťou rozptylu

Namerané hodnoty koncentrácií H_2O_2 v listoch boli výrazne vyššie v porovnaní s koncentráciami H_2O_2 v koreňoch. Medzi nameranými koncentráciami H_2O_2 v listoch ani koreňoch sme nezaznamenali štatisticky významné rozdiely.

2.4 Stanovenie peroxidácie lipidov

ROS sa podieľajú na procese peroxidácie membránových lipidov, pri ktorom je jedným z konečných produktov MDA. Jeho množstvo vieme detegovať využitím TCA, za vzniku fluorescenčného červeného derivátu, ktorý je spektrofotometricky

merateľný. Výsledné hodnoty znázornené v tabuľke 4 a grafe 4 sme získali z priemerov troch vzoriek.

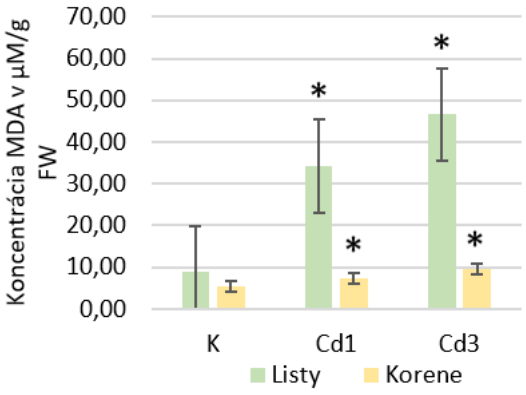
Tab. 4 Výsledné hodnoty koncentrácie MDA v µmol/g čerstvej hmotnosti listov a koreňov kontrolných rastlín, s koncentráciou 1 mg/l Cd a 3 mg/l Cd v substráte

	Koncentrácia MDA (list)	**Koncentrácia MDA (koreň)**
Kontrola	8,78 µmol	5,43 µmol
Cd 1 mg/l	34,22 µmol	7,27 µmol
Cd 3 mg/l	46,59 µmol	9,64 µmol

Najvyššie hodnoty koncentrácie MDA obsahovali vzorky listov a koreňov rastlín vystavených pôsobeniu 3 mg/l Cd, a to 46,59 µmol/g v listoch a 9,64 µmol/g v koreňoch. Štatisticky významný rozdiel sme zaznamenali pri porovnaní koncentrácií MDA vo vzorkách listov aj koreňov rastlín vystavených obom koncentráciám kadmia s kontrolnými vzorkami.

V listoch dochádza k 4-násobnému a 5-násobnému nárastu koncentrácie MDA pri 1 mg/l Cd a 3 mg/l Cd. V koreňoch sa nárast koncentrácie MDA prejavuje menej výrazne v porovnaní s listami, a to o 33,89 % pri 1 mg/l Cd a 77,44 % pri 3 mg/l Cd.

Štatisticky významné rozdiely pozorujeme aj pri porovnaní koncentrácií MDA medzi vzorkami rastlín vystavených Cd. Koncentrácie MDA vo vzorkách listov rastlín vystavených 3 mg/l Cd vykazujú 36,2 % nárast v porovnaní so vzorkami listov vystavených pôsobeniu len 1 mg/l Cd v substráte. Pri vzorkách koreňov pozorujeme rovnako nárast o 32,5 % pri zvýšení koncentrácie Cd.



Graf 4 Výsledné hodnoty koncentrácie MDA v µmol/g čerstvej hmotnosti listov a koreňov kontrolných rastlín, s koncentráciou 1 mg/l Cd a 3 mg/l Cd v substráte. Znázornené sú chybové úsečky štandardnej chyby priemeru a významnosť pri $p < 0,05$ (*) v rámci dvojvýberového t-testu s nerovnosťou rozptylu

Pri vzorkách listov aj koreňov nastáva zvyšovanie koncentrácie MDA so zvyšujúcou sa koncentráciou Cd v substráte. Zmeny v koncentrácii MDA sú výrazne vyššie v listoch v porovnaní s koreňmi.

Tan et al. [16] vykonali experiment na štyroch odrodách *Heliantus annuus* vystavených koncentráciám Cd 50 a 100 µM. Rastliny kultivovali 6 týždňov, s presunom do hydropónie na štvrtý týždeň a aplikáciou Cd v posledných dvoch týždňoch. Zaznamenali výraznú inhibíciu rastu v závislosti od odrody a koncentrácie Cd. Prítomnosť H_2O_2 stanovovali farbením DAB, s najvýraznejšími zmenami pri koncentrácii 100 µM Cd, a rôznou silou reakcie v závislosti od odrody.

Fu et al. [17] vykonali experiment na dvoch odrodách *Helianthus annuus* vystaveným koncentráciám 25, 50 a 100 µM. Rastliny kultivovali hydroponicky 20 dní, s následnou aplikáciou Cd počas siedmych dní. Zaznamenali zvyšovanie MDA v listoch so zvyšovaním koncentrácie Cd. Najvyššie koncentrácie H_2O_2 zaznamenali v rastlinách vystaveným pôsobeniu 25 a 50 µM Cd, s poklesom pri vystavení 100 µM Cd.

Saidi et al. [18] vykonali experiment na rastlinách *Helianthus annuus* vystavených pôsobeniu Cd v koncentráciách 5, 10, 15, 20, 50 a 100 µM. Rastliny nakličovali 4 dni, následne ich na 5 dní vystavili pôsobeniu Cd v hydropónii. Koncentrácie Cd 50 a 100 µM výrazne inhibovali rast, a tieto rastliny nepoužili v analýzach obsahu H_2O_2 a MDA. Najvyššie koncentrácie H_2O_2 a MDA v listoch zaznamenali v rastlinách vystavených 20 µM Cd, s 2-násobným (H_2O_2) a 3-násobným nárastom (MDA) v porovnaní s kontrolnými rastlinami.

Mikulová [12] a Petríková [14] pestovali 2 odrody *Helianthus annuus* v pôde s aplikovanými koncentráciami Cd 200 a 300 mg/kg, a porovnávali reakciu na prítomnosť Cd v závislosti od koncentrácie Cd, odrody a veku listov. V obidvoch experimentoch nezaznamenali viditeľný vplyv Cd na rast rastlín v porovnaní s kontrolou. Obsah EB zaznamenali výrazne vyšší v najmladších listoch, s hodnotami presahujúcimi korene 2-násobne. V koreňoch zaznamenali najnižšie poškodenie buniek v kontrolných rastlinách [12]. Koncentrácie MDA dosahovali hodnoty porovnateľné s našim experimentom. Pri koncentráciách H_2O_2 v koreňoch rovnako zaznamenali najvyššie hodnoty v kontrolných rastlinách [14].

Záver

Hlavnou témou tejto práce boli zmeny v oxidačnom strese rastlín slnečnice vyvolané pôsobením kadmia pri dvoch rôznych koncentráciách. Citlivosť rastlín na ťažké kovy a hromadenie ťažkých kovov v rastlinných organizmoch je téma, ktorej významnosť neustále narastá so zhoršujúcou sa kontamináciou pôd a vodných zdrojov. Experimenty venujúce sa reakciám rastlín na ťažké kovy v substráte sú kľúčové pri výbere vhodných odrôd na poľnohospodárske účely, alebo fytoremediáciu kontaminovaných substrátov.

Na základe našich výsledkov sme dospeli k záveru, že vplyv kadmia sa významne začal prejavovať na listoch pri koncentrácii 3 mg/l Cd v substráte. Listy rastlín vykazovali najmenšiu celkovú plochu a najvyššie % zafarbenej plochy pri *in situ* lokalizácii H_2O_2, najvyššiu mieru poškodenia buniek a najvyššie koncentrácie H_2O_2 a MDA pri spektrofotometrickom stanovení ich obsahu. Na koreňoch nebol tento vplyv jednoznačný, s hodnotami koncentrácií EB a H_2O_2 nižšími v porovnaní s kontrolnými vzorkami, a koncentráciou MDA vyššou v porovnaní s kontrolnými vzorkami.

Vplyv koncentrácie 1 mg/l C na rastliny na základe našich výsledkov nemôžeme označiť za jednoznačne negatívny. V porovnaní s kontrolou sme nezaznamenali významné zmenšenie listovej plochy, ani zvýšenú mieru poškodených buniek. Kým pri lokalizácii H_2O_2 *in situ* sme zaznamenali jeho zvýšené ukladanie v listoch, tieto hodnoty sa nezlučovali s výsledkami stanovenia obsahu H_2O_2 spektrofotometricky, kedy koncentrácia H_2O_2 bola znížená v porovnaní s kontrolou v listoch aj koreňoch. Zároveň vzorky koreňov vykazovali nižšiu mieru poškodenia buniek, ale naopak významne vyššie koncentrácie MDA v porovnaní s kontrolou.

Pri vzájomnom porovnaní vzoriek rastlín vystavených pôsobeniu Cd (1 a 3 mg/l) sme zaznamenali štatisticky významné rozdiely pri hodnotách koncentrácií MDA a EB, v listoch aj koreňoch, s nárastom týchto hodnôt pri zvýšení koncentrácie Cd. Tento efekt bol pozorovaný aj pri porovnaní koncentrácií H_2O_2 v listoch a koreňoch, a stanovení H_2O_2 *in situ* v listoch, namerané hodnoty ale nepoukázali na štatistickú významnosť.

Rozdiely v hodnotách medzi vzorkami rastlín vystavených odlišným koncentráciám Cd poukazujú na rozdiely medzi hydroponickým pestovaním a pestovaním v pevnom substráte, kedy sme zaznamenali štatistickú významnosť už pri zvýšení koncentrácie Cd o 2 mg/l. Pri porovnaní s experimentami, pri ktorých boli rastliny slnečnice, ale aj ďalšie druhy pestované v pôde, použité koncentrácie Cd v substráte mohli byť mnohonásobne vyššie bez prejavenia významných rozdielov.

Poďakovanie

Táto práca bola podporená riešením projektu VEGA 1/0073/20.

Chcela by som sa týmto spôsobom poďakovať môjmu školiteľovi doc. RNDr. Romanovi Kunovi, PhD. za pripomienky k práci, odborné vedenie, konzultácie a za všetok venovaný čas a trpezlivosť.

Použitá literatúra

[1] WAN, L. – ZHANG, H. 2012. Cadmium Toxicity – Effects on cytoskeleton, vesicular trafficking and cell wall construction. In Plant Signaling & Behavior, vol. 7, no. 3, pp. 345-348. ISSN 1559-2324.

[2] MELICHERČÍK, M. – MELICHERČÍKOVÁ, D. 1997. Bioanorganická chémia – chemické prvky a ľudský organizmus. Bratislava : Príroda, 188 s. ISBN 80-07-01028-9.

[3] ISMAEL, M. A. et al. 2019. Cadmium in plants: uptake, toxicity, and interactions with selenium fertilizers. In Metallomics : integrated biometal science, vol. 5, no. 1, pp. 255-277. ISSN 1756-591X.

[4] ACKOVA D. G. 2018. Heavy metals and their general toxicity for plants. In Plant Science Today, vol. 5, no. 1, pp. 14-18. ISSN 2348-1900.

[5] DAS, K. – ROYCHOUDHURY, A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. In Frontiers in Environmental Science, vol. 2, no. 1, pp. 53. ISSN 2296-665X.

[6] KÜPPER, H. – ANDRESEN, E. 2016. Mechanisms of metal toxicity in plants. In Metallomics : integrated biometal science, vol. 8, no. 3, pp. 269-285. ISSN 2348-1900.

[7] PIRŠELOVÁ, B. – MÉSZÁROS, P. 2019. Biológia stresu rastlín. Nitra : UKF, 135 s. ISBN 978-80-558-1376-9.

[8] NIU, L. et al. 2023. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in plants – A proteomic perspective of phytoremediation. In Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 256, no. 1, pp. 114882. ISSN 1090-2414.

[9] HOAGLAND, D. R. – ARNON, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley : The College of Agriculture, University of California, 31 s. 978-1013413407.

[10] KUMAR, D. et al. 2014. Histochemical detection of superoxide and H2O2 accumulation in *Brassica*

juncea seedlings. In Bio-protocol, vol. 4, no. 8, pp. e1108. ISSN 2331-8325.
[11] VIJAYARAGHAVAREDDY, P. et al. 2017. Quantification of Membrane Damage/Cell Death Using Evan's Blue Staining Technique. In Bio-protocol, vol. 7, no. 16, pp. e2519. ISSN 2331-8325.
[12] MIKULOVÁ, D. 2023. Fyziologická odpoveď rastlín na abiotický stres : diplomová práca. Nitra : UKF, 73 s.
[13] VELIKOVA, V. – YORDANOV, I. – EDREVA, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. In Plant Science, vol. 151, no. 1, pp. 59-66. ISSN 1873-2259.
[14] PETRÍKOVÁ, K. 2023. Hodnotenie fyziologických zmien na rastlinách slnečnice vystavených abiotickému stresu : diplomová práca. Nitra : UKF, 71 s.
[15] ZHOU, W. – LEUL, M. 1999. Uniconazole-induced tolerance of rape plants to heat stress in relation to changes in hormonal levels, enzyme activities and lipid peroxidation. In Plant Growth Regulation, vol. 27, no. 1, pp. 99-104. ISSN 1573-5087.
[16] TAN, D. et al. 2023. Physiological Response of Four Widely Cultivated Sunflower Cultivars to Cadmium Stress. In Horticulturae, vol. 9, no. 3, pp. 320. ISSN 2311-7524.
[17] FU, Y. et al. 2022. Physiological and Transcriptomic Comparison of Two Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Cultivars With High/Low Cadmium Accumulation. In Frontiers in Plant Science, vol. 13, no. 1, pp. 854386. ISSN 1664-462X.
[18] SAIDI, I. et al. 2021. Gallic acid improves the antioxidant ability against cadmium toxicity: Impact on leaf lipid composition of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. In Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 210, no. 1, pp. 111906. ISSN 1090-2414.

Antimikrobiálne vlastnosti nanočastíc striebra pripravených zelenou syntézou

Antimicrobial properties of silver nanoparticles prepared by green synthesis

Dominika Gunárová[1]
Školiteľ: Eva Ürgeová[1]
[1]Ústav biológie a biotechnológie, Oddelenie biológie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
gunarova1@ucm.sk,eva.urgeova@ucm.sk

Abstrakt
V posledných rokoch pozorujeme narastajúci trend zvyšovania rezistencie patogénov na antimikrobiálne látky. Tento efekt súvisí s nadmerným a nekontrolovaným užívaním antibiotík. Pre oblasť medicíny a priemyselných aplikácií je tento rozvoj odolnosti baktérií, húb, vírusov a parazitov voči rôznym antimikrobiálnym látkam vo všeobecnosti nežiaduci a predstavuje problém, a preto existuje naliehavá potreba hľadať nové a účinné antimikrobiálne látky. Nanočastice predstavujú účinnú stratégiu pri zvyšovaní bakteriálnej rezistencie. Zelená syntéza nanočastíc striebra je ekologicky šetrná technika, ktorá s využitím prírodných extraktov predstavuje alternatívu k fyzikálne a chemicky syntetizovaným nanočasticiam. Antibakteriálne vlastnosti nanočastíc striebra, nasyntetizovaných s využitím extraktu z kôry bio pomaranča, bio citróna a z listov bazalky, boli stanovené u Gram-pozitívnych baktérií: *M. luteus* DSM 1790 a *B. subtilis* DSM 5552, Gram-negatívnych baktérií: *E. coli* CCM 3954, *P. syringae* a *E. asburiae* CCM 8546. Disková difúzna metóda potvrdila vyššiu antibakteriálnu účinnosť testovaných nanočastíc na Gram-pozitívne baktérie.

Kľúčové slová: antimikrobiálna aktivita, disková difúzna metóda, nanočastice striebra, zelená syntéza

Abstract
In recent years, we have observed an increasing trend of increasing the resistance of pathogens to antimicrobial substances. This effect is related to the excessive and uncontrolled use of antibiotics. For the field of medicine and industrial applications, this development of resistance of bacteria, fungi, viruses and parasites to various antimicrobial agents is generally undesirable and a problem, and therefore there is an urgent need to search for new and effective antimicrobial agents. Nanoparticles represent an effective strategy for increasing bacterial resistance. Green synthesis of silver nanoparticles is an ecologically friendly technique that, with the use of natural extracts, represents an alternative to physically and chemically synthesized nanoparticles. Antibacterial properties of silver nanoparticles, synthesized using extracts from orange, lemon and basil leaves, were determined for Gram-positive bacteria: *M. luteus* DSM 1790 and *B. subtilis* DSM 5552, Gram-negative bacteria: *E. coli* CCM 3954, *P. syringae* and *E. asburiae* CCM 8546. The disc diffusion method confirmed the higher antibacterial efficiency of the tested nanoparticles on Gram-positive bacteria.

Key words: antimicrobial activity, disk diffusion method, silver nanoparticles, green synthesis

Úvod

V poslednej dobe je globálne vnímaná rastúca potreba hľadať nové antimikrobiálne substancie, keďže vo svete narastá problém s liečbou mnohých nozokomiálnych infekcií a alimentárnych nákaz spôsobených multirezistentnými patogénmi, pretože súčasné antibiotické terapie voči nim nie sú účinné [1, 2, 3]. V súčasnosti sa výskumy zameriavajú na vývoj novej generácie účinných antimikrobiálnych činidiel, s využitím nanotechnológií [4].

Už od staroveku existujú dôkazy o mikrocídnych letálnych účinkoch esenciálnych a neesenciálnych kovov, ktoré sú nevyhnutné pre biochemické procesy všetkých živých organizmov. Použitie kovov ako antimikrobiálnych činidiel má silný vedecký význam [5, 6, 7]. Ióny kovu interagujú s bunkovými membránami alebo môžu byť viazané na štruktúru antibiotika a zosilňovať tak jeho biocídnu aktivitu [8]. V oblasti nanotechnológií vyvolala mikrocídna povaha kovov

veľký záujem, pričom existujú rôzne spôsoby syntézy nanočastíc, ale zelená syntéza sa v porovnaní s inými metódami považuje za najekologickejší a najefektívnejší spôsob [9, 10]. Nevýhodou mnohých fyzikálnych a chemických metód syntézy bolo najmä použitie zložitej techniky, energetická a ekonomická náročnosť a vysoká toxicita použitých reagencií. Zelená syntéza naopak predstavuje veľmi rýchlu, jednoduchú, spoľahlivú a netoxickú variantu pre produkciu nanočastíc striebra, nakoľko využíva rôzne biologické entity, čo je z pohľadu ekológie šetrnejšie pre životné prostredie [11, 12]. Nasyntetizované nanočastice kovov, ako napríklad meď, zinok, titán, horčík, zlato a najmä striebro našli uplatnenie v biomedicínskej oblasti [13].

V porovnaní s inými kovmi v nano forme majú nanočastice striebra s vysokým pomerom povrchovej plochy k objemu vysoký antibakteriálny účinok proti viacerým vysoko rezistentným druhom mikroorganizmov ako *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus* [14].

1 Materiál a metódy

1.1 Príprava nanočastíc striebra

Nanočastice striebra boli nasyntetizované na Oddelení biotechnológií ÚBB FPV UCM v Špačinciach metódou zelenej syntézy. Extrakty boli získané z čerstvej kôry bio plodov pomarančovníka čínskeho (*Citrus sinensis* L.), citrónovníka pravého (*Citrus limon* L.) a listov bazalky pravej (*Ocimum basilicum* L.). Pri zelenej syntéze nanočastíc bol použitý $AgNO_3$ ako soľ koordinujúceho kovu.

V experimentálnej časti práce boli použité nanočastice striebra vo forme koloidných roztokov, resp. po vysušení koloidného roztoku v tuhej forme, riedené destilovanou vodou a Mueller-Hintonovej bujónom. Otestovali sme antibakteriálne vlastnosti piatich roztokov nanočastíc striebra (Tab. 1): nanočastice z kôry bio pomaranča, koncentrácia $AgNO_3$ v roztoku 1 M; sušina bola rozpustená v destilovanej vode; nanočastice z kôry bio citróna, koncentrácia $AgNO_3$ v roztoku 1 M; sušina bola rozpustená v destilovanej vode; koloidné roztoky nanočastíc z listov bazalky, koncentrácia $AgNO_3$ v roztoku 3 mM a 4 mM.

Tab. 1 Charakteristika použitých roztokov nanočastíc striebra (upravené podľa [15])

Rastlina	Časť použitá pre extrakciu	pH extraktu	Pomer extrakt a $AgNO_3$	Koncentr. $AgNO_3$
C. sinensis	Kôra	4,95	1 : 9	1 M
C. limon	Kôra	5,11	1 : 9	1 M
O. basilicum	List	6,4	1 : 9	3 mM
O. basilicum	List	6,4	1 : 9	4 mM
O. basilicum	List	7,0	1 : 5	4 mM

1.2 Stanovenie sušiny nanočastíc striebra

0,5 ml koloidného roztoku sme sušili v blokovom termostate 4 hod pri 90 °C. Vykonali sme tri paralelné stanovenia.

Výsledný obsah sušiny pre jednotlivé koloidné roztoky sme vyjadrili ako mg sušiny/ml.

1.3 Bakteriálne kmene

Použité bakteriálne kmene boli získané z Oddelenia biológie FPV UCM v Špačinciach. Antimikrobiálnu aktivitu nanočastíc striebra sme testovali na dvoch Gram-pozitívnych druhoch: *Bacillus subtilis* DSM 5552, *Micrococcus luteus* DSM 1790 a troch Gram-negatívnych druhoch: *Enterobacter asburiae* CCM 8546, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas syringae*.

Kultúry boli uchovávané v chladničke pri teplote 4 °C na šikmých mäsopeptónových agaroch.

1.4 Disková difúzna metóda

Disková difúzna metóda je štandardizovaná metóda, ktorá je určená na semikvantitatívne stanovenie citlivosti alebo rezistencie podľa toho, či vyšetrovaný mikroorganizmus v stanovenej koncentrácii buniek na agarovej pôde vytvorí alebo nevytvorí zónu inhibície okolo disku s určitou koncentráciou antimikrobiálneho činidla po predpísanej dobe inkubácie. Priemery zón sa merajú vrátane diskov v troch rôznych smeroch a výsledky sa uvádzajú v milimetroch. Antimikrobiálna aktivita testovanej látky je tým väčšia, čím väčší je priemer inhibičnej zóny [16].

Experiment sme vykonali podľa Sharifi-Rada a kol. [17] s miernou modifikáciou. Na stanovenie

antibakteriálneho účinku nanočastíc striebra sme pracovali s pomnoženou bakteriálnou kultúrou v exponenciálnej fáze rastu. Baktérie sme inkubovali v Mueller-Hintonovej bujóne na trepačke 4 hod/30 °C/150 rpm. Po skončení inkubácie sme zmerali optickú denzitu a pomnoženú kultúru sme zriedili sterilným Mueller-Hintonovej bujónom na zákal 0,5 °McF. Na Petriho misky (priemer 90 mm) so stuhnutým Mueller-Hintonovej agarom sme naočkovali 100 µl pomnoženej kultúry baktérií. Papierové disky (priemer 6 mm) zhotovené z filtračného papiera a vysterilizované v sušiarni 2,5 hod/160 °C sme po vsiaknutí inokula do agaru sterilne rozmiestnili na povrch jednotlivých agarových platní. Sušinu nanočastíc sme rozpustili v destilovanej vode, prípadne sme riedili sterilnou destilovanou vodou priamo koloidný roztok nanočastíc. Na každý disk sme naniesli 20 µl roztokov s rôznou, klesajúcou koncentráciou nanočastíc. Platne sme inkubovali pri teplote 30 °C počas 24 hodín, staticky. Antibakteriálnu aktivitu sme vyhodnotili meraním priemeru čírych inhibičných zón (v mm) v 3 rôznych smeroch. Všetky roztoky nanočastíc sme testovali v dvoch paralelných meraniach.

2 Výsledky a diskusia

Analýzu antibakteriálnej aktivity testovaných koloidných roztokov nanočastíc striebra sme vykonali diskovou difúznou metódou stanovením priemernej veľkosti inhibičných zón u vybraných bakteriálnych kmeňov (Obr. 1 a 2).

Na rozmiestnené disky sme naniesli roztoky nanočastíc syntetizované s využitím extraktu z pomarančovej a citrónovej kôry v koncentráciách sušiny: 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,062 mg/ml, 0,031 mg/ml. Zásobný roztok sme pripravili rozpustením sušiny v destilovanej vode v pomere 1:1. Pri roztokoch nanočastíc nasyntetizovaných z extraktu z bazalkových listov sme pracovali s pôvodným koloidným roztokom. Roztok nanočastíc nasyntetizovaných z extraktu z listov bazalky (pH extraktu = 6,4; pomer extraktu:$AgNO_3$ = 1:9; koncentrácia $AgNO_3$ = 3 mM) bol na rozmiestnené disky nanesený v koncentráciách sušiny 1,2 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,075 mg/ml, 0,0375 mg/ml. Rovnako sme riedili aj ďalší roztok nanočastíc z bazalky (pH extraktu = 6,4; pomer extraktu:$AgNO_3$ = 1:9; koncentrácia $AgNO_3$ = 4 mM), pričom koncentrácie sušiny nanočastíc, ktoré sme nanášali na disky, boli nasledovné: 1,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, 0,45 mg/ml, 0,225 mg/ml, 0,1125 mg/ml, 0,05625 mg/ml. Tretí roztok nanočastíc z bazalky (pH extraktu = 7,0; pomer extraktu:$AgNO_3$ = 1:5; koncentrácia $AgNO_3$ = 4 mM) bol nariedený na koncentrácie sušiny: 1,7 mg/ml, 0,85 mg/ml, 0,425 mg/ml, 0,2125 mg/ml, 0,10625 mg/ml, 0,053125 mg/ml.

V práci Quiroz-Hernándeza a kol. [20] bola potvrdená vyššia antibakteriálna účinnosť nanočastíc striebra voči Gram-pozitívnym baktériám *Staphylococcus aureus*. Na biosyntézu bol použitý vodný extrakt z kôry pomaranča. Pri mechanizme antibakteriálnej aktivity nanočastíc je dôležitý povrchový náboj bakteriálnych buniek, pretože väčší rozdiel v hodnotách povrchového zeta potenciálu medzi Gram-pozitívnymi baktériami a nanočasticami spúšťa lepšiu internalizáciu nanočastíc do buniek.

V našej práci sme potvrdili mierne vyššiu účinnosť nanočastíc striebra pripravených syntézou z kôry pomaranča na Gram-pozitívne druhy *M. luteus* a *B. subtilis,* ako uvádzajú Quiroz-Hernández a kol. [20]. Najväčšiu antibakteriálnu aktivitu nanočastíc striebra sme zaznamenali u *M. luteus* s rozsahom priemerných veľkostí inhibičných zón 16,0 – 9,3 mm pri koncentráciách 1 – 0,031 mg sušiny/ml. *B. subtilis* vykazoval mierne nižšie priemerné hodnoty veľkosti inhibičných zón v rozsahu 14,3 – 7,3 mm pri rovnakých koncentráciách. U Gram-negatívnych baktérií sme dokázali pri rovnakom rozsahu koncentrácií 1 – 0,031 mg sušiny/ml najvyššiu antibakteriálnu účinnosť u *E. coli* s priemernými hodnotami veľkosti inhibičných zón 13,0 – 7,3 mm, u *P. syringae* boli priemerné hodnoty v rozsahu 11,7 – 6,7 mm. *E. asburiae* vykazoval najväčšiu odolnosť voči použitým nanočasticiam a priemerné hodnoty veľkosti zón inhibície boli nižšie – rozsah zodpovedal hodnotám 10,8 – 6,0 mm pri koncentráciách 1 – 0,25 mg sušiny/ml, pri koncentráciách nižších ako 0,125 mg sušiny/ml sme inhibičné zóny nepozorovali (Tab. 2).

Tab. 2 Hodnoty priemerných inhibičných zón [mm] u jednotlivých baktérií– testované nanočastice z kôry bio pomaranča

	Koncentrácia nanočastíc [mg sušiny/ml]					
	1	**0,5**	**0,25**	**0,125**	**0,062**	**0,031**
M. luteus	16,0	14,3	12,3	11,7	10,2	9,3
B. subtilis	14,3	12,5	11,5	9,7	8,7	7,3
E. coli	13,0	11,5	11,0	9,5	8,5	7,3
P. syringae	11,7	11,0	10,2	9,2	8,0	6,7
E. asburiae	10,8	9,3	6,0	Bez zóny	Bez zóny	Bez zóny

V štúdii Alaallaha a kol. [21] uvádzajú, že nanočastice striebra nasyntetizované z kôry citróna preukázali vyššiu antibakteriálnu aktivitu voči Gram-pozitívnym baktériám, pričom priemerná veľkosť inhibičných zón bola v rozsahu 4,11 – 25,87 mm pre *Staphylococcus aureus* a 1,38 – 22,3 mm pre *Escherichia coli* pri koncentráciách sušiny nanočastíc 10, 25, 50 a 100 µg/ml. Výsledný efekt je pripisovaný povrchovému náboju nanočastíc striebra a jeho interakciám s negatívne nabitým povrchom bakteriálnej bunky.

Naše výsledky potvrdzujú vyššiu antibakteriálnu účinnosť nanočastíc striebra pripravených syntézou z citrónovej kôry na Gram-pozitívne baktérie *M. luteus* a *B. subtilis,* rovnako ako v štúdii Alaallaha a kol. [21]. Najväčšiu antibakteriálnu účinnosť sme pozorovali u *M. luteus* s rozsahom priemerných veľkostí inhibičných zón 16,5 – 8,5 mm pri koncentráciách 1 – 0,031 mg sušiny/ml. U *B. subtilis* boli pri rovnakých koncentráciách nanočastíc priemerné hodnoty veľkosti inhibičných zón v rozsahu 11,5 – 6,0 mm. Antibakteriálna účinnosť na Gram-negatívne baktérie (koncentračný rozsah 1 – 0,031 mg sušiny/ml) bola porovnateľná, u *E. coli* sme pozorovali inhibičné zóny s priemernými hodnotami 12,5 – 6,7 mm, u *E. asburiae* 10,5 – 6,5 mm. *P. syringae* vykazoval väčšiu odolnosť voči nanočasticiam z kôry citróna, priemerné veľkosti inhibičných zón boli najnižšie – v rozsahu hodnôt 9,7 – 6,2 mm (Tab. 3).

Tab. 3 Hodnoty priemerných inhibičných zón [mm] u jednotlivých baktérií– testované nanočastice z kôry bio citróna

	Koncentrácia nanočastíc [mg sušiny/ml]					
	1	**0,5**	**0,25**	**0,125**	**0,062**	**0,031**
M. luteus	16,5	15,5	13,5	11,5	10,5	8,5
B. subtilis	11,5	10,5	9,5	8,5	7,0	6,0
E. coli	12,5	11,0	9,8	8,8	7,5	6,7
P. syringae	9,7	9,2	8,3	7,7	7,0	6,2
E. asburiae	10,5	9,5	8,5	7,8	7,2	6,5

V práci Pirtarighata a kol. [22] testovali antibakteriálnu aktivitu biosyntetizovaných nanočastíc z bazalky proti Gram-pozitívnym druhom *Bacillus subtilis*, *Bacillus vallismortis* a Gram-negatívnemu druhu *Escherichia coli*. Pri stanovení antibakteriálnej aktivity nanočastíc syntetizovaných z extraktu z listov bazalky bol koloidný roztok obsahujúci nanočastice pripravený zmiešaním 1 ml vodného extraktu *O. basilicum* (pripraveného varením vysušených rozomletých listov v destilovanej vode) a 9 ml vodného roztoku dusičnanu strieborného (1mM). Najväčšie inhibičné zóny mali Gram-pozitívne baktérie *B. vallismortis* (15 mm) a *B. subtilis* (13 mm). Zóna inhibície u Gram-negatívnej *E. coli* mala veľkosť 12 mm. Zvýšená citlivosť Gram-pozitívnych baktérií je podľa autorov spôsobená rozdielnou stavbou bunkovej steny medzi Gram-pozitívnymi a Gram-negatívnymi baktériami. Jedna peptidoglykánová vrstva u Gram-pozitívnych baktérií pravdepodobne nie je účinnou bariérou proti vonkajším zložkám, zatiaľ čo vonkajšia fosfolipidová membrána Gram-negatívnych baktérií robí bunkovú stenu menej priepustnou pre antibakteriálne látky.

Výsledky z nášho experimentu potvrdzujú vyššiu antibakteriálnu aktivitu nanočastíc, pripravených syntézou z listov bazalky, na Gram-pozitívne baktérie *M. luteus* a *B. subtilis* ako aj v prípade štúdie Pirtarighata a kol. [22]. V prípade prvého testovaného roztoku nanočastíc z bazalky (koncentračný rozsah sušiny 1,2 – 0,038 mg/ml) bola veľkosť inhibičných zón u *M. luteus* 15,0 – 8,5 mm, u *B. subtilis* 12,2 – 7,0 mm. U Gram-negatívnych druhov boli hodnoty veľkosti inhibičných zón nižšie ako u Gram-pozitívnych: u *E. asburiae* 11,0 – 6,7 mm, u *E. coli* 10,7 – 6,2 mm a u *P. syringae* 9,6 – 5,8 mm. Druhý testovaný roztok nanočastíc z bazalky (koncentračný rozsah sušiny 1,8 – 0,056 mg/ml) bol rovnako účinnejší na Gram-pozitívne druhy *M. luteus* a *B. subtilis.* Veľkosť inhibičných zón vytvorených *M. luteus* bola 16,7 – 10,5 mm, *B. subtilis* vytváral inhibičné zóny s veľkosťou 13,0 – 6,7 mm. Medzi Gram-negatívnymi druhmi boli inhibičné zóny porovnateľné: u *E. coli* v rozsahu 11,5 – 6,8 mm, *E. asburiae* mal veľkosť inhibičných zón v rozsahu 11,3 – 6,5 mm a *P. syringae* vytváral inhibičné zóny v rozsahu 10,8 – 6,8 mm. Tretí testovaný roztok nanočastíc z bazalky (koncentračný rozsah sušiny 1,7 – 0,053 mg/ml) mal rovnako mierne vyššiu antibakteriálnu aktivitu na baktérie *M. luteus* a *B. subtilis.* Veľkosť inhibičných zón u *M. luteus* bola v rozmedzí hodnôt 16,5 – 8,5 mm a u *B. subtilis* 11,5 – 6,3 mm. U Gram-negatívnych druhov sme pozorovali porovnateľné inhibičné zóny: u *P. syringae* 11,0 – 6,3 mm, u *E. coli* 11,0 – 6,5 mm a u *E. asburiae* 10,5 – 6,3 mm (Tab. 4).

Tab. 4 Hodnoty priemerných inhibičných zón [mm] u jednotlivých baktérií– testované nanočastice z listov bazalky 1, 2 a 3

	Koncentrácia nanočastíc BAZALKA 1 [mg sušiny/ml]					
	1,2	**0,6**	**0,3**	**0,15**	**0,075**	**0,038**
M. luteus	15	13,2	11,8	10,5	9,5	8,5
B. subtilis	12,2	11,2	10,3	9	7,8	7
E. coli	10,7	10	9,3	9	7,3	6,2
P. syringae	9,6	8,5	7,8	7,3	6,8	5,8
E. asburiae	11	10,2	9,5	9,3	7	6,7
	Koncentrácia nanočastíc BAZALKA 2 [mg sušiny/ml]					
	1,8	**0,9**	**0,45**	**0,225**	**0,113**	**0,056**
M. luteus	16,7	15,5	14,5	13,3	12	10,5
B. subtilis	13	11	9,7	9,2	7,8	6,7
E. coli	11,5	10,5	9,5	8,7	7,8	6,8
P. syringae	10,8	10	9,3	8,3	7,2	6,8
E. asburiae	11,3	10	9	8	7,3	6,5
	Koncentrácia nanočastíc BAZALKA 3 [mg sušiny/ml]					
	1,7	**0,85**	**0,425**	**0,213**	**0,106**	**0,053**
M. luteus	16,5	14,5	12,5	11	9,5	8,5
B. subtilis	11,5	10,5	9	8	7,2	6,3
E. coli	11	9,5	8,8	7,8	7	6,5
P. syringae	11	10	9,3	8,8	7,8	6,3
E. asburiae	10,5	9,5	9	7,8	7,2	6,3



Obr. 1 Výsledné inhibičné zóny – testovaný roztok nanočastíc z bazalky (pomer extrakt:$AgNO_3$ = 1:5; koncentrácia $AgNO_3$ = 4 mM) na Gram-pozitívne baktérie



Obr. 2 Výsledné inhibičné zóny – testovaný roztok nanočastíc z bazalky (pomer extrakt:$AgNO_3$ = 1:5; koncentrácia $AgNO_3$ = 4 mM) na Gram-negatívne baktérie

Záver

V predloženej práci sme stanovili antibakteriálne účinky nanočastíc striebra, nasyntetizovaných zelenou syntézou s použitím extraktov kôry bio pomaranča, bio citróna a listov bazalky.

Dokázali sme antibakteriálny účinok nanočastíc striebra na Gram-pozitívne aj Gram-negatívne baktérie, ktoré môžu byť využité v rôznych oblastiach priemyslu, vedy a zdravotníctva, napríklad v environmentálnych biotechnológiách, bioinžinierstve, pri úprave a dezinfekcii vôd, ako katalyzátory, v medicíne, farmácii ako nosiče antibiotík a liekov v asociácii so znižovaním potrebných terapeutických dávok liečiv, v poľnohospodárstve, kozmetike, balení potravín a mnohých ďalších sektoroch s perspektívnymi aplikáciami.

Výsledky diskovej difúznej metódy potvrdili vyšší antibakteriálny účinok nanočastíc striebra na Gram-pozitívne druhy baktérií. Najväčšie zóny inhibície vytváral *M. luteus* – 16,7 mm pri nanočasticiach vytvorených z extraktu z bazalkových listov, ktorý mal medzi otestovanými extraktmi najvyšší obsah sušiny v koloidnom roztoku (1,8 mg/ml).

Poďakovanie

Touto cestou sa chcem poďakovať Bc. Simone Tkáčikovej za poskytnutie nasyntetizovaných koloidných roztokov nanočastíc striebra.

Výskum sme realizovali vďaka grantovej podpore projektu VEGA 1/0230/24.

Použitá literatúra

[1] FRANCI, G. a kol. 2015. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. In: *Molecules*, vol. 20, no. 5. ISSN: 8856-8874. Doi:10.3390/molecules20058856.

[2] KLEVENS, R. M. a kol. 2007. Invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in the

United States. In: *Jama*, vol. 298, no. 15. ISSN: 1763-1771. Doi: 10.1001/jama.298.15.1763.

[3] WALKER, B. a kol. 2009. Looming global-scale failures and missing institutions. In: *Science*, vol. 325, no. 5946. ISSN: 1345-1346. Doi: 10.1126/science.1175325.

[4] VIMBELA, G. V. a kol. 2017. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. In: *International journal of nanomedicine*, vol. 12, pp. 3941. Doi: 10.2147%2FIJN.S134526.

[5] ALEXANDER, J. W. a kol. 2009. History of the medical use of silver. In: *Surgical infections*, vol. 10, no. 3, pp. 289-292. Doi:10.1089/sur.2008.9941.

[6] BORKOW, G., GABBAY, J. 2009. Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections. In: *Current Chemical Biology*, vol. 3, no. 3, pp. 272-278. Doi:10.2174/187231309789054887.

[7] LEMIRE, J. A., HARRISON, J. J., TURNER, R. J. 2013. Box 3: the Fenton reaction, free radical chemistry and metal poisoning. In: *Nat Rev Microbiol*, vol. 11, pp. 371-384. Doi:10.1038/nrmicro3028.

[8] CHOHAN, Z. H., SUPURAN, C. T., SCOZZAFAVA, A. 2005. Metal binding and antibacterial activity of ciprofloxacin complexes. In: *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 20, no. 3, pp. 303-307. Doi: 10.108 0/14756360310001624948.

[9] KHARISSOVA, O. V. a kol. 2013. The greener synthesis of nanoparticles. In: *Trends in biotechnology*, vol. 31, no. 4, pp. 240-248. Doi:10.1016/j.tibtech.2013.01.003.

[10] MAKAROV, V. V. a kol. 2014. "Green" nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. In: *Acta Naturae (англоязычная версия)*, vol. 6.1, no. 20, pp. 35-44. Doi: 10.32607/20758251-2014-6-1-35-44.

[11] IRAVANI, S. a kol. 2014. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. In: *Research in pharmaceutical sciences*, vol. 9, no. 6, pp. 385-406. PMCID: PMC4326978.

[12] NATSUKI, J. a kol. 2015. A review of silver nanoparticles: synthesis methods, properties and applications. In: *Int. J. Mater. Sci. Appl*, vol. 4, no. 5, pp. 325-332. Doi: 10.11648/J.IJMSA.20150405.17.

[13] AZIZI, S. a kol. 2014. Green biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using brown marine macroalga Sargassum muticum aqueous extract. In: *Materials Letters*, vol. 116, pp. 275-277. Doi: 10.1016/j.matlet.2013.11.038.

[14] GURUNATHAN, S. a kol. 2014. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. In: *Nanoscale research letters*, vol. 9, no. 1, pp. 1-17. Doi: 10.1186/1556-276X-9-373.

[15] TKÁČIKOVÁ, S. 2024. *Príprava strieborných nanočastíc a ich vplyv na klíčivosť semien a vitalitu rastlín: diplomová práca.* Trnava: FPV UCM.

[16] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J. a kol. 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Moskva, Triton. ISBN: 859-4315-0528-0.

[17] SHARIFI-RAD, M., POHL, P., EPIFANO, F. a kol. 2020. Green synthesis of silver nanoparticles using Astragalus tribuloides delile root extract: Characterization, antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities. In: *Nanomaterials*, vol. 10, no. 12, p.2383. Doi: 10.3390/nano10122383.

[18] SCHINDLER, J. 2010. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Grada Publishing as. 224 s. ISBN: 978-80-247-3170-4.

[19] ERJAEE, H., RAJAIAN, H., NAZIFI, S. 2017. Synthesis and characterization of novel silver nanoparticles using Chamaemelum nobile extract for antibacterial application. In: *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 8, no. 2, p.025004. Doi: 10.1088/2043-6254/aa690b.

[20] QUIROZ-HERNÁNDEZ, J. E., KHARISSOVA, O. V., AGUIRRE-ARZOLA, V. E. a kol. 2020. Evaluation of the conditions for the synthesis of silver nanoparticles from orange peels and its antibacterial effect. In: *Recent Patents on Nanotechnology*, vol. 14, no. 3, pp.250-258. ISSN: 2212-4020. Doi: 10.2174/1872210514666200414101014.

[21] ALAALLAH, N. J., ABD ALKAREEM, E., GHAİDAN, A. 2023. Ecofriendly approach for silver nanoparticles synthesis from lemon extract and their antioxidant, anti-bacterial, and anti-cancer activities. In: J*ournal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, vol. 10, no. 1, pp.205-216. Doi: 10.18596/jotcsa.1159851.

[22] PIRTARIGHAT, S., GHANNADNIA, M., BAGHSHAHI, S. 2019. Biosynthesis of silver nanoparticles using Ocimum basilicum cultured under controlled conditions for bactericidal application. In: *Materials Science and Engineering: C*, vol. 98, pp. 250255. ISSN: 0928-4931. Doi: 10.1016/j.msec.2018.12.090.

LAMP detekcia patogénov *Xanthomonas euvesicatoria* a *Xanthomonas gardneri* z osiva vybraných kultivarov kapusty

LAMP detection of *Xanthomonas euvesicatoria* pathogens and *Xanthomonas gardneri* from seed of selected cabbage cultivars

Romana Chovaniaková[1]
Školiteľ: Zuzana Gerši[1]
1Oddelenie biológie, Ústav biológie a biotechnológie FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2 917 01 Trnava
2796568@ucm.sk, zuzana.gersi@ucm.sk

Abstrakt

Rod *Xanthomonas* zahŕňa niekoľko patovarov, ktoré sú najmä rastlinnými patogénmi a spôsobujú rôzne ochorenia hospodársky dôležitých plodín vrátane druhov z čeľade Brassicaceae, a to na celom svete. *Xanthomonas euvesicatoria* a *Xanthomonas gardneri* preukázateľne patria medzi najčastejšie kmene napádajúce kapustovité plodiny. Tieto patogény spôsobili v priebehu rokov značné straty na úrode. Z tohto dôvodu je veľmi dôležitá prevencia a výber neinfikovaného osiva pre pestovanie poľnohospodárskych plodín. V práci prinášame návrh metodického postupu na identifikáciu vybraných kmeňov bakteriálnych patogénov z rodu *Xanthomonas*. Experimentálna časť práce je zameraná na skríning bakteriálnej infekcie (*X. euvesicatoria* a *X. gardneri)* osiva 6 kultivarov kapusty s využitím metódy LAMP. Pomocou tejto rýchlej metódy sme potvrdili prítomnosť *X. euvesicatoria* a *X. gardneri* v 3, resp. 2 vzorkách neskorých odrôd kapusty hlávkovej, zatiaľ čo osivo skorej odrody kapusty hlávkovej ako aj kapusty pekinskej infikované nebolo.

Kľúčové slová: *Brassica sp*., detekcia patogénov, LAMP, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*

Abstract

The genus *Xanthomonas* includes several pathovars that are mainly plant pathogens and causes various diseases of economically important crops, including species of Brassica family, worldwide. *Xanthomonas euvesicatoria* and *Xanthomonas gardneri* are demonstrably among the most common strains attacking cabbage crops. These pathogens have caused significant crop losses over the years. For this reason, prevention and selection of uninfected seed for growing agricultural crops is very important. In this work, we propose a methodical procedure for the identification of pathogens from the genus *Xanthomonas*. The experimental part of the work is focused on the screening of the bacterial infection (*X. euvesicatoria* and *X. gardneri*) of the seeds of 6 cabbage cultivars using the LAMP method. Using this rapid method, we confirmed the presence of *X. euvesicatoria* and *X. gardneri* in 3 and 2 (respectively) samples of late varieties of cabbage, while the seeds of early varieties of cabbage and Chinese cabbage were not infected.

Key words: *Brassica sp*., pathogen detection, LAMP, *Xanthomonas euvesicatoria, Xanthomonas gardneri*

Úvod

Kapusta (*Brassica oleracea*), z čeľade *Brassicaceae* a rodu *Brassica* (*Cruciferae*) je jednou z najpestovanejších druhov zeleniny na svete. *Brassicaceae* je celosvetovo rozšírená monofyletická skupina 338 známych rodov a približne 3700 druhov.

Xanthomonas je gramnegatívna aeróbna rovná tyčinkovitá baktéria, ktorá patrí do čeľade *Pseudomadaceae*. Na platni so živným agarom vytvárajú kolónie so žltým pigmentom. *Xanthomonas* patrí medzi gamaproteobaktérie a zahŕňa 27 druhov. V rode *Xanthomonas* sa nachádzajú početné fytopatogénne baktérie [1]. Fytopatogénne xanthomonády infikujú viac ako 400 hostiteľov v 57 dvojklíčnolistových čeľadiach a 11 jednoklíčnolistových čeľadiach [2].

Bakteriálna škvrnitosť je charakteristická nekrotickými léziami na listoch, ktoré sa objavia počas nástupu symptómov následne dochádza k vysychaniu a sfarbeniu do tmavohneda až čierna s vlhkým až mastným vzhľadom [3]. V pokročilejších štádiách dochádza k hnilobe a rozsiahlej nekróze

pletiva až k bunkovej smrti [4]. V súčasnosti sa pozornosť zameriava na dva hlavné patogény spôsobujúce túto škvrnitosť a to, *X. euvesicatoria* a *X. gardneri* [5]. Rozšírenie *X. euvesicatoria* bolo historicky globálne, pričom v poslednom čase sa zvýšili izolácie *X. gardneri* v rôznych geografických lokalitách [6]. Aby vo výsadbe prepuklo ochorenie, stačí jedno kontaminované semeno medzi 10 000 zdravými semenami [7].

Dôležitosť prevencie pred ochorením je nevyhnutná už pri produkcii osiva na komerčné účely. Jedným z nevyhnutných prevenčných opatrení je testovanie osiva. Efektívnou molekulárnou metódou pre detekciu a identifikáciu bakteriálnych patogénov z rodu *Xanthomonas* je metóda inovatívnej izotermickej amplifikačnej techniky známa ako LAMP. V princípe ide o molekulárnu techniku amplifikácie nukleovej kyseliny, kedy sa súbor štyroch až šiestich samostatných primerov viaže na šesť až osem rôznych miest na cieľovom géne, vďaka čomu je zabezpečená vysoká špecifickosť [8].

Cieľom práce bolo detegovať prítomnosť bakteriálnych patogénov *X. euvesicatoria* a *X. gardneri* v 6 vzorkách osiva rôznych odrôd kapusty s využitím špecificky navrhnutých LAMP primerov.

1 Materiál a metódy

V tejto kapitole si podrobne popíšeme materiál, s ktorým budeme pracovať počas výskumu ako aj jednotlivé fázy prípravy prác.

1.1 Rastlinný materiál

Zdrojom rastlinného materiálu v experimentálnej časti práce bolo osivo vybraných kultivarov kapusty (*Brassica sp*.). Testovali sme osivo viacerých odrôd kapusty hlávkovej (1 skorá odroda: cv. Zora (Semo); 3 neskoré odrody: cv. Kalibos, cv. Avak F1 (Moravoseed) a cv. Polar (Semo)) a kapusty pekinskej (cv. Capitol (Moravoseed) a cv. Hilton (Semo)). Testované osivo od spoločnosti Moravoseed bolo vopred vyhodnotené (výrobcom) ako potenciálne napadnuté neznámym patogénom, zatiaľ čo osivo od spoločnosti Semo bolo z predaja (predpoklad nekontaminovaného osiva).

1.2 Príprava biologického materiálu

Počiatočný krok analýzy zahŕňal eluáciu potenciálnych patogénov z povrchu osiva. Vzorky osiva (500 mg) sme pretrepávali počas 2,5 h pri laboratórnej teplote na orbitálnej trepačke pri 125 ot./min. v 5 ml nuclease-free vody.

Časť takto získaného eluátu (20 µl) sme naniesli a rozotreli na pevnom živnom médiu (0,3 % hovädzí extrakt, 0,5 % peptón, 1,5 % agar) v Petriho miskách (Ø 9 cm). Vzorky sme inkubovali v inkubátore (LABWITM ZWY200D) po dobu 2 dní pri 30 °C.

Sterilným špáradlom sme jednotlivo odpichli kolónie a uvoľnili do 5 µl 1 % roztoku Triton X-100. Takto pripravené bunkové suspenzie sme použili ako templát DNA na ďalšie analýzy.

Kvalitu bakteriálnej DNA sme overili v 0,6 % agarózovom géli. DNA sme vizualizovali UV-transiluminátorom.

Následne sme vzorky bunkových izolátov použili priamo ako templáty DNA do LAMP analýzy.

1.3 Detekcia prítomnosti patogénov na povrchu osiva zeleniny pomocou LAMP

Detekciu patogénov *X. euvesicatoria* a *X. gardneri* potenciálne prítomných na povrchu osiva rôznych kultivarov kapusty sme vykonávali pomocou špecifických LAMP primerov.

Pri detekcii patogénu *X. euvesicatoria* sme použili súbor primerov LAM XeRec-F3 (5´-CCATGTAGGGCTTGTTGACG-3´), LAM XeRec-B3 (5´-GGTGGTCGCATCTTCATTGG-3´), LAM XeRec-FIP (5´-ACCCGCTCACGGAAAACGTGCC-TTCAGCGATGGACAGC-3´), LAM XeRec-BIP (5´-GAGGCCACGTTGGCGATGAGGTGAACGACGGTTCG-3´), LAM XeRec-LF (5´- ACCCGGCAGGCA-GGCACGGTGCT-3´), LAM XeRec-LB (5´-AGCAACGTCGGCGCCGGATA-3´) pre identifikáciu génu ATP-závislej DNA helikázy (*recG*).

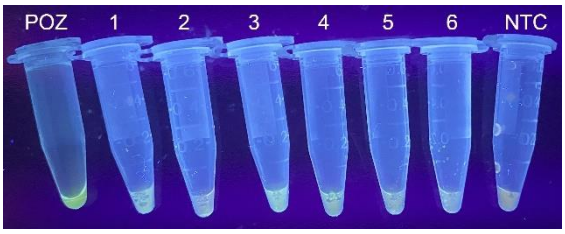
X. gardneri sme detegovali pomocou sady LAMP primerov špecifických pre gén *hrpB:* LAM XG F3 (5´-CGGGGTGCAGGTCAGC-3´), LAM XG B3 (5´-ACCGGCACCGCCAAG-3´), LAM XG FIP (5´-CCACCTCGGCACGTTGCAGGCGAGGTATGCGAGTTGC-3´), LAM XG BIP (5´-GCCGCCATCTCGCCTTGC-GCCCCGATCCGATCACG-3´), LAM XG LoopB (5´-CGAGCTGGTGGGCTTGT-3´).

Reakčnú zmes sme pripravili podľa odporúčania výrobcu použitej sady Saphir Bst Turbo Polymerase (Jena Bioscience) zmiešaním potrebných komponentov (2 µl Saphir Bst Turbo Buffer, 1,6 µl $MgSO_4$ Stock, 2,8 µl dNTP Mix, 2 µl Primer Mix, 0,8 µl Saphir Bst Turbo Polymerase, 10,04 µl H_2O) s 1 µl DNA (bunkový lyzát). Reakčnú zmes sme inkubovali na termobloku pri teplote 65 °C po dobu 20 minút. V ďalšom kroku sme zvýšili teplotu na 90 °C (0,05 °C/sek) a vzorky sme ďalej inkubovali po dobu 20 minút. Po pridaní reakčného farbiva Eva Green DNA Stain (0,26 µl) sme získané výsledky amplifikácie

vizualizovali pomocou UV-transiluminátora pri vlnovej dĺžke 257 nm a následne fotograficky zdokumentovali.

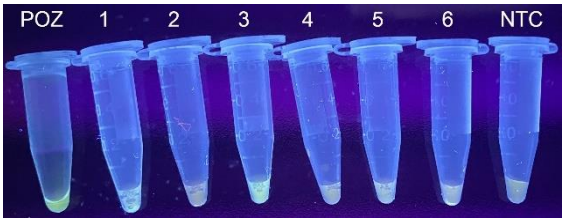
2 Výsledky a diskusia

Pomocou LAMP metódy sme potvrdili prítomnosť bakteriálnych patogénov *X. euvesicatoria* na povrchu osiva všetkých 3 testovaných odrôd kapusty hlávkovej neskorej (cv. Polar, cv. Kalibos, cv. Avak F1). Osivo skorej odrody kapusty ako aj 2 testované kultivary pekinskej kapusty neboli infikované *X. euvesicatoria.* Výsledky detekcie rastlinného patogénu sú uvedené na Obr. 1.



Obr. 1 Detekcia patogénov *Xanthomonas euvesicatoria* pomocou LAMP primerov. POZ – pozitívna kontrola (DNA izolovaná z baktérií *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe2591), dodané z MENDELU v Brne), 1 – kapusta hlávková neskorá (cv. Polar), 2 – kapusta pekinská (cv. Capitol), 3 – kapusta hlávková neskorá (cv. Kalibos), 4 – kapusta hlávková neskorá (cv. Avak F1), 5 – kapusta pekinská (cv. Hilton), 6 – kapusta hlávková skorá (cv. Zora), NTC – negatívna kontrola.

Pri detekcii patogénov rodu *X. gardneri* pomocou LAMP primerov sme zaznamenali prítomnosť tohto patogénu len u 2 spomedzi 6 testovaných odrôd kapusty (Obr. 2). *X. gardneri* bol potvrdený na povrchu osiva hlávkovej kapusty neskorej (cv. Kalibos a cv. Polar).



Obr. 2 Detekcia patogénov *Xanthomos gardneri* pomocou LAMP primerov. POZ - pozitívna kontrola (DNA izolovaná z baktérií *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe2591), dodané z MENDELU v Brne), 1 – kapusta hlávková neskorá (cv. Polar), 2 – kapusta pekinská (cv. Capitol), 3 – kapusta hlávková neskorá (cv. Kalibos), 4 – kapusta hlávková neskorá (cv. Avak F1), 5 – kapusta pekinská (cv. Hilton), 6 – kapusta hlávková skorá (cv. Zora), NTC – negatívna kontrola.

Zo získaných výsledkov vyplýva, že neskoré odrody kapusty hlávkovej môžu byť častejšie postihované ochorením vyvolaným pôvodcom *X. euvesicatoria a X. gardneri* v porovnaní so skorou odrodou ako aj pekinskou kapustou. Takto infikovaný biologický materiál nie je vhodný na komerčný predaj v dôsledku šírenia ochorenia.

Z pohľadu testovaných vzoriek osív od spoločností Moravoseed môžeme konštatovať, že bakteriálna patogenita spôsobená *X. euvesicatoria* bola potvrdená u 2 odrôd osiva (cv. Kalibos a Avak F1), pričom *X. gardneri* sme potvrdili aj na povrchu osiva kultivaru Kalibos.

Spomedzi 3 testovaných vzoriek osiva zakúpených od spoločnosti Semo sme identifikovali prítomnosť *X. euvesicatoria* ako aj *X. gardneri* len u jednej odrody kapusty (cv. Polar).

Kolektív autorov [9] vo svojej štúdii vyvinul kolorimetrický test založený na LAMP v reálnom čase ako špecifickú, citlivú a spoľahlivú detekciu na diferenciáciu patogénu *X. gardneri*. Na návrh primerov bol vybratý gén *hrpB* kvôli jeho vysokej druhovej špecifickosti. Testy LAMP zreteľne amplifikovali DNA *X. gardneri* v osive plodín z rodu *Brassica*. *Hrp* génový klaster bol predtým úspešne použitý ako cieľ pre molekulárnu detekciu fytopatogénnych baktérií.

Medzi ďalšie bežné ciele patria gény pre ribozomálnu RNA, *atpD*, *gumD*, *gyrB*, *rpfB* a mnohé ďalšie alebo iné neanotované sekvencie získané analýzou celého genómu. Amplifikácia pomocou LAMP bola detegovaná vo väčšine prípadov po 30 minútach, avšak na základe opakovania detekcie je odporúčaná 60 minútová amplifikácia kvôli možným odchýlkam v nastavení detekcie v rôznych laboratóriách [10]. LAMP analýza nachádza široké uplatnenie v diagnostike pretože nevyžaduje izoláciu baktérií a taktiež ani nákladné prístrojové vybavenie. Citlivosť LAMP sa líši od patogénu k patogénu, pravdepodobne v dôsledku bakteriálnych funkčných charakteristík, ako sú baktérie produkujúce a neprodukujúce extracelulárne polysacharidy [11].

Záver

Rod *Brassica* patrí do čeľade rastlín, ktorá zahŕňa širokú škálu hospodársky dôležitej zeleniny. Vzhľadom na ich význam ako poľnohospodárske plodiny, ako aj ich náchylnosť k rôznym rastlinným patogénnym baktériám spôsobujúcim choroby, ktoré môžu viesť k závažným stratám na výnosoch, je veľmi dôležité podrobnejšie študovať interakcie patogén – rastlina. Včasná detekcia je pre poľnohospodársku produkciu kľúčová z hľadiska prevencie ochorenia. LAMP detekčná metóda

rastlinných patogénov je efektívna metóda prinášajúca rýchle výsledky (do 1 hodiny) získané len vizuálnou kontrolou.

V našom experimente sme pomocou metódy LAMP potvrdili patogenitu testovaných kmeňov *X. euvesicatoria* v 3 zo 6 testovaných vzoriek osiva a prítomnosť *X. gardneri* v prípade 2 zo 6 skúmaných vzoriek osiva kultivarov kapusty.

Tieto výsledky prinášajú cenné poznatky pre producentov osiva v zmysle posúdenia kvality dlhodobo skladovaného osiva (v prípade spoločnosti Moravoseed), resp. možností pre ne/uvoľnenie osiva na trh (infikované osivo od Semo v predaji). Zároveň ponúkame producentom návrh technicky nenáročnej a pritom vysoko efektívnej detekčnej metodiky, ktorú je možné aplikovať v krátkom čase aj v podmienkach bez vedeckého zázemia s cieľom monitorovať produkčnú kvalitu.

Táto práca bola podporená INTERREG 304011X035.

Použitá literatúra

[1] ŠAMEC, Dujna et al. 2016. White cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata f. alba*): botanical, phytochemical and pharmacological overview. In Phytochemistry Reviews, vol. 1, no. 16, pp. 117-135. ISSN 1568-7767

[2] BARAK, Jeri et al. 2016. Whole-genome sequences of Xanthomonas euvesicatoria strains clarify taxonomy and reveal a stepwise erosion of type 3 effectors. In Frontiers in Plant Science, vol. 7, pp. 1805. ISSN 1664462X

[3] RITCHIE, David 2000. Bacterial spot of pepper and tomato. In The Plant Health Instructor, vol. 10.

[4] VANCHEVA, Taca et al. 2021. Molecular Epidemiology of Xanthomonas euvesicatoria Strains from the Balkan Peninsula Revealed by a New Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Scheme. In Microorganisms, vol. 9, no. 3, pp. 536. ISSN 20762607

[5] JONES, Jeffrey et al. 2004. Reclassification of the Xanthomonads Associated with Bacterial Spot Disease of Tomato and Pepper. In Systematic and Applied Microbiology, vol. 27, no. 6, pp. 755-762. ISSN 0723-2020

[6] POTNIS, Neha et al. 2015. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. In Molecular Plant Pathology, vol. 16, no. 9, pp. 907-920. ISSN 1364-3703

[7] VINCENTE, Joana et al. 2012. *Xanthomonas campestris pv. campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. In Molecular plant pathology, vol. 14, no. 1, pp. 2-18. ISSN 1364-3703

[8] NOTOMI, Tsugunori et al. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. In Nucleic Acids Research, vol. 28, no. 12, pp. 63. ISSN 0305-1048

[9] STEHLÍKOVÁ, Dagmar et al. 2020. Development of Real-Time and Colorimetric Loop Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of Xanthomonas gardneri. In Microorganisms, vol. 8, no. 99, pp. 12. ISSN 2076-2607

[10] LANGOIS, Paul et al. 2017. Characterization of the *Xanthomonas* translucens complex using draft genomes, comparative genomics, phylogenetic analysis, and diagnostic LAMP assays. In Phytopathology, vol. 5, no. 107, pp. 519-527. ISSN 0031949X

[11] LANG, Jillian et al. 2014. Sensitive detection of Xanthomonas oryzae pathovars oryzae and oryzicola by loop-mediated isothermal amplification. In Applied and Environmental Microbiology, vol. 80, no. 15, pp. 4519-4530. ISSN 10985336

Príprava domácich parených kysnutých knedieľ s vyšším obsahom β-D-glukánov

Preparation of homemade steamed leavened dumplings with higher content of β-D-glucans

Daniel Jánoška[1] – Michaela Havrlentová[1]
Školiteľ: Michaela Havrlentová[1]
[1]Oddelenie biotechnológií, ÚBB, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
[1]janoska1@ucm.sk, michaela.havrlentova@ucm.sk

Abstrakt
Cieľom práce bolo pripraviť inovatívnu funkčnú potravinu, konkrétne domácu parenú kysnutú knedľu s vhodnými senzorickými vlastnosťami a vyšším obsahom β-D-glukánov. Dve odrody ovsa siateho slovenskej proveniencie sme použili pri príprave zmesných múk s 2,5 až 25 % podielom ovsenej celozrnnej múky. Dokázali sme, že vplyvom spracovania múky, kysnutia a tepelnej úpravy dochádza k poklesu hladiny β-D-glukánov. Po senzorickom hodnotení finálnych výrobkov sme zistili, že najlepšie výsledky dosiahli v porovnaní s knedľou z kontrolnej pšeničnej múky, knedle s obsahom ovsa do 10 %. Knedle s prídavkom ovsa vyšším ako 15 % boli pre finálneho konzumenta neprijateľné.
Kľúčové slová: ovos, funkčné látky zrna, funkčné potraviny, potravinové spracovanie, β-D-glukány

Abstract
The aim of the work was to prepare an innovative functional food, specifically homemade steamed leavened dumpling with suitable sensory properties and a higher content of β-D-glucans. We used two varieties of oat of Slovak origin in the preparation of mixed flours with a 2,5 to 25 % proportion of oat whole grain flour. We proved that the level of β-D-glucans decreases because of flour processing, leavening, and heat treatment. After the sensory evaluation of the final products, we found that the best results compared to the control dumpling achieved the dumpling with oat content up to 10 %. Dumplings with an addition of oats higher than 15 % were unacceptable to the final consumer.
Key words: oat, functional substances of grain, functional foods, processing, β-D-glucans

Úvod
V posledných desaťročiach bol množstvom výskumov dokázaný významný vzťah medzi stravovacími návykmi a ľudským zdravím. Kvôli značnému nárastu počtu ľudí trpiacich obezitou, vysokým krvným tlakom, srdcovými ochoreniami a inými chronickými chorobami sa rapídne zvýšila potreba spoločnosti po potravinách s vlastnosťami podporujúcimi zdravie. Začlenenie takýchto funkčných potravín do ľudského jedálnička predstavuje zásadný nástroj prevencie a liečby veľkého množstva civilizačných ochorení.

Zdravotný význam využitia obilnín pri príprave funkčných potravín spočíva v prítomnosti rozpustnej vlákniny v obilninových zrnách. Najzásadnejšou zložkou rozpustnej vlákniny obsiahnutej vo vybraných obilných zrnách sú β-D-glukány [1]. Práve špecifická štruktúra obilninových β-D-glukánov umožňuje po natrávení v črevnom trakte vytvoriť viskózne prostredie, čo je považované za hlavný mechanizmus zodpovedný za ich pozitívne účinky na zdravie [2]. V súčasnej dobe je tiež do veľkej miery známe použitie obilninových β-D-glukánov ako zahusťovadiel, stabilizátorov a náhrady tukov v potravinách [3].

Tieto a mnoho iných vlastností obilninových β-D-glukánov v súčasnosti povzbudzujú množstvo výskumníkov a výrobcov potravín, aby do väčšej miery preskúmali jednak fyzikálno-chemické vlastnosti týchto polysacharidov, ale aj vplyv spracovania primárnych obilninových surovín na ich reologické a senzorické vlastnosti pri príprave funkčných potravín s pozitívnymi zdravotnými účinkami na ľudskú populáciu. Cieľom našej práce bolo preskúmať možnosti využitia primárnej potravinovej suroviny s vyšším obsahom β-D-glukánov pri dizajnovaní funkčnej potraviny na báze obilnín.

1 Materiál a metódy

V tejto kapitole si podrobne popíšeme materiál, s ktorým budeme pracovať počas výskumu ako aj metódy, ktoré použijeme pri práci na výskume.

1.1 Materiál

Odrodu žltoplevnatého ovsa siateho (Prokop, plevnaté zrná sme odplevnili) a nahého ovsa siateho (Inovec) sme použili pri príprave zmesných múk zložených z kontrolnej pšeničnej polohrubej múky (Vitaflora, Mlyn Kolárovo, a.s.) a ovsenej celozrnnej múky s percentuálnym obsahom od 2,5 do 25 %.

Príprava domácej parenej kysnutej knedle bola realizovaná v spolupráci s Hotelovou akadémiou Ľudovíta Wintera v Piešťanoch na vyučovacom predmete Technológia prípravy jedál, kde sa kladie dôraz hlavne na dodržiavanie technologických postupov a s potravinami je nakladané v súlade so systémom HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points). Je to uznávaný prístup ku kontrole hygieny potravín počas celého výrobného procesu [4].

Pri výrobnom procese domácej parenej kysnutej knedle boli použité tieto ingrediencie: 250 g múky, 60 ml mlieka, 60 ml vody, ½ čajovej lyžičky soli, 1 ks vajca, 1 polievková lyžica oleja, 10 g droždia a 1 čajová lyžička kryštálového cukru. Zmiešaním 50 ml vody s mliekom, droždím a jednou čajovou lyžičkou kryštálového cukru sme si pripravili kvások, ktorý sme nechali vykysnúť. K zvyšnému mlieku a vode sme pridali vajce a olej a všetky tieto suroviny sme spolu rozmiesili pomocou univerzálneho robota RM-200H. Po vymiesení sme vláčne cesto nechali kysnúť počas približne 40 minút v tme a pri laboratórnej teplote. Po vykysnutí sme cesto vyformovali do podlhovastého oválneho tvaru, dali na dierkovaný plech potretý olejom a parili v elektrickom parnom konvektomate značky Lainox pri teplote 100 °C počas 20 minút. Po uplynutí 20 minút sme knedľu napichali špajdľami, aby sa uvoľnil prebytočný vzduch a potreli olejom. Knedle sme podrobili ďalším analýzam v ich čerstvom stave a po vysušení.

1.2 Metódy

Obsah β-D-glukánov vo vzorkách sme realizovali na základe analytického kitu „Mixed-linkage β-glucan assay procedure“ (KBGLU, BBG 5/03, metóda na stanovenie obsahu β-D-glukánu) (McCleary, 2006) od firmy Megazyme Ltd. Jej princíp je založený na pôsobení enzýmov na prirodzený β-D-glukán vo vzorke a jeho následnom rozklade pomocou enzýmov lichenáza a β-glukozidáza až na glukózové monoméry. Množstvo získanej glukózy sa stanoví následne pomocou činidla GOPOD spektrofotometrickou metódou.

Po príprave cesta a jeho následnom vykysnutí sme hodnotili rozdiely v tvare a štruktúre cesta pozorovaním na základe subjektívneho vnímania. V porovnaní s kontrolnou vzorkou sme pri všetkých ostatných knedliach pozorovali odlišné spracovateľské vlastnosti cesta, ktoré vznikali pri jeho príprave, akými sú lepivosť, konzistencia alebo tuhosť cesta. Po následnej tepelnej úprave samotnej knedle sme hodnotili parametre ako dĺžka a šírka knedieľ a hmotnosť. Oproti kontrolnej vzorke sme hodnotili farbu knedle a povrchovú štruktúru. Po vyhodnotení základných parametrov celých knedieľ sme ich v polovici rozkrojili a oproti kontrolnej vzorke sme porovnávali farbu striedky, konzistenciu a pórovitosť. Tiež sme sledovali chuť, netradičné príchute a konzistenciu. Senzorické hodnotenie bolo vykonané aj pomocou bodovej stupnice senzorického hodnotenia. Na hodnotení sa zúčastnilo 10 respondentov, ktorými boli študenti Hotelovej akadémie Ľudovíta Wintera v Piešťanoch. V rámci senzorického hodnotenia bolo hodnotených 8 parametrov na bodovej stupnici od 1 (najhoršie) do 5 (najlepšie) (Tabuľka 1).

Tab. 1 Parametre hodnotené v rámci senzorického hodnotenia a vysvetlivky k bodovému hodnoteniu.

Tvar knedle	5	typický oválny, dobre nakysnutý
	4	stredne oválny, stredne nakysnutý
	3	mierne oválny, mierne nakysnutý
	2	nepravidelný, podlhovastý
	1	plochý, nenakysnutý
Farba povrchu knedle	5	typická, svetlá, lesklá
	4	menej svetlá, lesklá
	3	stredne svetlá
	2	tmavšia s žltastým nádychom
	1	tmavá s hnedastým nádychom
Vôňa knedle	5	typická knedľová
	4	menej výrazná
	3	málo výrazná
	2	nevýrazná alebo s kyslým nádychom
	1	cudzia (napr. veľmi kyslá)
Chuť knedle	5	veľmi príjemná
	4	typická knedľová
	3	menej výrazná
	2	nevýrazná alebo s pachuťou
	1	cudzia (napr. veľmi horká)

Pokračovanie Tab. 1 Parametre hodnotené v rámci senzorického hodnotenia a vysvetlivky k bodovému hodnoteniu.

Pórovitosť knedle	5	rovnomerná, jemné steny, stredné póry
	4	menej rovnomerná, jemné steny, stredné póry
	3	nerovnomerná, hrubšie steny, menšie dutiny
	2	drobivá, husté póry, hrubé steny
	1	mazľavá, oddelená od kôrky, takmer bez pórov
Farba vnútra knedle po rozkrojení	5	normálna, typická
	4	s jemným odtieňom
	3	so silnejším odtieňom
	2	tmavšia
	1	tmavá
Lepivosť knedle po požití	5	veľmi málo lepivá
	4	málo lepivá
	3	stredne lepivá
	2	dosť lepivá, mierne tuhá
	1	veľmi lepivá, veľmi tuhá
Celkový dojem z výrobku	5	výborný
	4	veľmi dobrý
	3	priemerný
	2	podpriemerný
	1	veľmi zlý

Zvyšky knedieľ sme pokrájali na menšie časti, vysušili pri laboratórnej teplote, pomleli a použili na analýzu obsahu β-D-glukánov.

Všetky získané dáta sme štatisticky vyhodnotili pomocou t-testu a analýzou ANOVA a následným post hoc testom LSD (Least Significant Difference) pri hladine významnosti $\alpha = 0,05$ využitím štatistického programu Statgraphics XVII – X64.

2 Výsledky a diskusia

V tejto kapitole si zhrnieme všetky dosiahnuté výsledky pomocou použitých metód a porovnáme ich.

2.1 Obsah β-D-glukánu v zmesných múkach

Ako je uvedené v Tabuľke 2 v prípade použitia plevnatej odrody Prokop, najnižšiu hodnotu β-D-glukánov mala vzorka kontrolnej pšeničnej múky (0,23 % ± 0,02). S pribúdajúcim množstvom ovsa v zmesnej múke sme pozorovali stúpajúcu tendenciu obsahu β-D-glukánov, pričom najväčší nárast obsahu nastal pri prídavku 25 % ovsa, kedy v porovnaní so zmesnou múkou s 20 % prídavkom ovsa, hodnota β-D-glukánov stúpla o 0,31 %. Najnižší nárast sme zase zaznamenali pri 2,5 % prídavku ovsa, kedy v porovnaní s obsahom β-D-glukánov v kontrolnej pšeničnej múke, ich hodnota narástla o 0,06 %. Najvyššiu hodnotu β-D-glukánov sme stanovili v múke s 25 % obsahom ovsa odrody Prokop (1,28 % ± 0,01).

Tab. 2 Obsah β-D-glukánov (v %) v zmesných múkach pripravených z ovsa siateho odrody Prokop.

Zmesná múka	Priemerná hodnota	Smerodajná odchýlka
Kontrolná pšeničná múka	0,23	0,02
Múka s 2,5 % ovsa	0,29	0,01
Múka s 5 % ovsa	0,43	0,03
Múka s 7,5 % ovsa	0,47	0,01
Múka s 10 % ovsa	0,62	0,01
Múka s 15 % ovsa	0,84	0,02
Múka s 20 % ovsa	0,97	0,01
Múka s 25 % ovsa	1,28	0,01

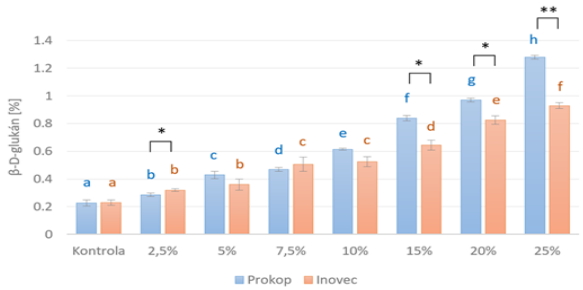
V tabuľke 3 vidíme priemerný obsah β-D-glukánov v zmesných múkach s prídavkom zrna nahej odrody Inovec. V porovnaní s kontrolnou vzorkou s pribúdajúcim množstvom ovsa v zmesnej múke sme pozorovali stúpajúcu tendenciu obsahu β-D-glukánov, pričom najväčší nárast obsahu nastal pri prídavku 20 % ovsa, kedy v porovnaní so zmesnou múkou s 15 % prídavkom ovsa hodnota β-D-glukánov stúpla o 0,18 %. Najnižší nárast sme zase zaznamenali pri 10 % prídavku ovsa, kedy v porovnaní s obsahom β-D-glukánov v zmesnej múke s 7,5 %, ich hodnota narástla iba o 0,02 %. Najvyššiu hodnotu β-D-glukánov (0,93 % ± 0,02) sme stanovili v zmesnej múke s 25 % prídavkom ovsa odrody Inovec.

Tab. 3 Obsah β-D-glukánov (v %) v zmesných múkach pripravených z ovsa siateho odrody Inovec.

Zmesná múka	Priemerná hodnota [%]	Smerodajná odchýlka
Kontrolná pšeničná múka	0,23	0,02
Múka s 2,5 % ovsa	0,32	0,01
Múka s 5 % ovsa	0,36	0,04
Múka s 7,5 % ovsa	0,51	0,05
Múka s 10 % ovsa	0,53	0,04
Múka s 15 % ovsa	0,65	0,04
Múka s 20 % ovsa	0,83	0,03

Porovnaním percentuálnych obsahov β-D-glukánov v oboch druhoch zmesných múk sme zistili, že väčšiu variabilitu sme dosiahli pri hodnotení múk

pripravených z ovsa odrody Prokop, kde sa percentuálny rozsah pohyboval v rozmedzí od 0,23 % do 1,28 %, na rozdiel od múky z ovsa odrody Inovec, kde múka s 25 % prídavkom dosiahla podstatne nižšiu hodnotu 0,93 %. Na základe tohto porovnania môžeme predpokladať, že pri príprave zmesných múk s cieľom následnej prípravy funkčných potravín s vyšším prídavkom β-D-glukánov je v našom prípade odroda plevnatého ovsa siateho Prokop vhodnejšia ako odroda nahého ovsa siateho Inovec (Graf 1). Z výsledkov vyplýva, že štatisticky preukazné rozdiely v obsahu β-D-glukánov v zmesných múkach pripravených z odrôd Prokop a Inovec boli pozorované pri zmesných múkach s prídavkom 2,5 % a 15 až 25 %. Obsah β-D-glukánov v múkach s odrodou Inovec je nižší ako pri odrode Prokop vo všetkých prípadoch okrem 2,5 %. Štatisticky najvýznamnejší pokles obsahu β-D-glukánov v zmesnej múke medzi hodnotenými odrodami bol v zmesnej múke s 25 % obsahom ovsa.



Graf 1 Štatistické vyhodnotenie obsahu β-D-glukánov v zmesných múkach pripravených z odrôd Prokop a Inovec.

Vysvetlivky: Rozdielne malé písmená predstavujú štatisticky významný rozdiel (LSD, α = 0,05) a štatistika bola robená samostatne pre každú odrodu. Porovnanie obsahu β-D-glukánov medzi odrodou Prokop a Inovec v rámci každého variantu bola robená pomocou t-testu pri hladine významnosti *α = 0,05, **α = 0,001.

2.2 Hodnotenie spracovateľských vlastností cesta a senzorické hodnotenie domácich parených kysnutých knedieľ

V prvej časti celého výrobného procesu sme hodnotili správanie zmesných múk pri miesení cesta v porovnaní s kontrolnou pšeničnou múkou. Pri miesení cesta zo zmesných múk s prídavkom odrody Inovec sme v porovnaní s kontrolou nepozorovali žiadne významné rozdiely pri múkach s 2,5 až 10 % obsahom ovsenej celozrnnej múky. Pri múke s 15 % koncentráciou ovsa sme však pozorovali, že cesto po vymiesení je podstatne redšie, tmavšie, lepivejšie a ťažšie sa s ním pracuje pri následnej manipulácii, pričom s pribúdajúcim množstvom ovsa v zvyšných zmesných múkach boli spracovateľské vlastnosti cesta ešte horšie a manipulácia náročnejšia.

Po vymiesení cesta sme skúmali ako bude na jeho tvar a štruktúru vplývať proces kysnutia. Podobne ako v predchádzajúcom prípade, pri knedliach s 2,5 až 10 % obsahom ovsa sme nepozorovali žiadne významné rozdiely oproti kontrole. Pri vyšších podieloch ovsa sme však pozorovali značné rozdiely vo farbe cesta, ktorá bola viditeľne tmavšia a cestá zostali rovnako lepivé a náročné na manipuláciu ako po vymiesení.

Hodnotili sme vplyv tepelnej úpravy na vlastnosti výsledného produktu. Zistili sme, že knedle s 2,5 až 10 % prídavkom ovsa sú z hľadiska tvaru a štruktúry porovnateľné s kontrolou, avšak knedľa s 5 % prídavkom ovsa je viditeľne menšia oproti ostatným. Pri knedliach s obsahom ovsa od 15 do 25 % sme už pozorovali značne významnejšie rozdiely oproti kontrole. Knedle boli po upečení viditeľne tmavšie ako zvyšné, na povrchu mali viditeľne tmavé fľaky a jemné praskliny. Ich tvar nie je v porovnaní s kontrolnou vzorkou tak oblý, ale skôr podlhovastý a hlavne po stranách značne nepravidelný. Pri knedle s 20 % prídavkom ovsa je na povrchu viditeľná veľká prasklina po celej jej dĺžke (Obrázok 1).



Obr. 1 Knedle pripravené zo zmesných múk s prídavkom ovsa Inovec (zľava: kontrola; 2,5 %; 5 %; 7,5 %; 10 %; 15 %; 20 %; 25%).

Hmotnosť knedieľ sa pohybovala v rozmedzí od 377 do 441 g, pričom najväčšiu hmotnosť sme zaznamenali pri kontrole. Najnižšiu hmotnosť sme namerali pri knedle s 25 % prídavkom ovsenej celozrnnej múky (377 g). Dĺžka dosahovala hodnoty 20,5 (5 % prídavok ovsa) až 22,5 cm (kontrola, 10 % prídavok ovsa). Posledným hodnoteným parametrom bola šírka v najširšom mieste. Najužšia bola knedľa s 25 % prídavkom ovsa (9 cm) a najširšia kontrola (10 cm).

V porovnaní s kontrolou sme pri knedle s 2,5 % obsahom ovsa Inovec pozorovali vo vnútri mierne dutiny. V knedliach s 5 % až 10 % prídavkom sme vyhodnotili parameter pórovitosti ako porovnateľný s kontrolnou vzorkou. V knedliach s vyšším obsahom

ovsa sme pozorovali miernu stratu pórovitosti, tmavosť a knedle neboli zvnútra tak dobre upečené (Obrázok 2).



Obr. 2 Knedle pripravené zo zmesných múk s prídavkom ovsa odrody Inovec po rozkrojení (zľava: kontrola; 2,5 %; 5 %; 7,5 %; 10 %; 15 %; 20 %; 25%).

V poslednej časti sme hodnotili senzorické vlastnosti pripravených knedieľ. Podobne ako v predchádzajúcich hodnoteniach, knedle s obsahom ovsa do 10 % sú z hľadiska chuti veľmi podobné kontrole, avšak so stúpajúcou hodnotou ovsa v zmesných múkach sme pozorovali intenzívnejšiu vôňu výsledného produktu, ktorá bola viditeľne kyslejšia oproti kontrole. Pri knedliach s 15 až 25 % obsahom ovsa Inovec sme pri konzumácii pozorovali, že sú knedle tuhšie a mierne sa lepia na podnebie. Z hľadiska chuťových vlastností sme jediný významný rozdiel zaznamenali až pri knedle s obsahom ovsa na úrovni 25 %, ktorá mala citeľne horkastú dochuť.

Podobne ako v prípade ovsa Inovec sme hodnotili aj múky a knedle s prídavkom plevnatej odrody Prokop. Na rozdiel od zmesných múk pripravených z ovsa odrody Inovec, s ktorými sa do 10 % koncentrácie pracovalo pri miesení porovnateľne ako s kontrolou, sa so zmesnými múkami z odrody Prokop pracovalo oveľa horšie. Už cesto vymiesené z múky s 2,5 % prídavkom ovsa sa pri manipulácii lepilo na ruky a trhalo sa. Podobne to bolo aj pri ostatných zmesných múkach. Po následnom vykysnutí cesta a jeho vytvarovaní do podlhovastého tvaru sme pozorovali, že hlavne cestá pripravené z múk s 5 až 10 % obsahom ovsa sa mierne roztekajú do strán a nedržia kompaktný tvar. Cestá pripravené z múk s vyšším obsahom ovsa boli tuhšie.

Po upečení všetky knedle veľmi dobre vykysli, ale na ich povrchu boli malé (2,5 až 10 % ovsa) alebo veľké (15 % a 25 %) praskliny po celej dĺžke. Z hľadiska tvaru boli všetky knedle, odhliadnuc od nepravidelností na povrchu, veľmi podobné kontrolnej vzorke. Iba knedľa s 20 % obsahom ovsa mala mierne hruškovitý tvar oproti ostatným s typicky oválnym tvarom (Obrázok 3).



Obr. 3 Knedle pripravené zo zmesných múk s prídavkom ovsa Prokop (zľava: kontrola; 2,5 %; 5 %; 7,5 %; 10 %; 15 %; 20 %; 25%).

Hmotnosť pripravených knedieľ sa pohybovala v rozmedzí od 409 (15 % ovsa) do 441 g (kontrola). Dĺžka dosahovala hodnoty 21 (5 % ovsa) až 23,5 cm (kontrola, 20 % ovsa). Najužšia bola knedľa s 2,5 % prídavkom ovsa (9,5 cm) a najširšia z múky so 7,5 % a 25 % prídavkom ovsa (11,5 cm).

Po rozkrojení knedieľ sme v porovnaní s kontrolnou vzorkou zhodnotili knedľu so 7,5 % prídavkom ovsa za najprijateľnejšiu z hľadiska pórovitosti. Takisto bola veľmi dobre nakysnutá, veľmi jemná, vláčna, mäkká a s dobrou pružnosťou. Pri knedliach s 15 až 25 % obsahom ovsa sme pozorovali stratu pórovitosti, knedle neboli dobre dopečené a po rozkrojení nedržali kompaktnú štruktúru a mierne sa rozsýpali (Obrázok 4).



Obr. 4 Knedle pripravené zo zmesných múk s prídavkom ovsa Prokop po rozkrojení (zľava: kontrola; 2,5 %; 5 %; 7,5 %; 10 %; 15 %; 20 %; 25%).

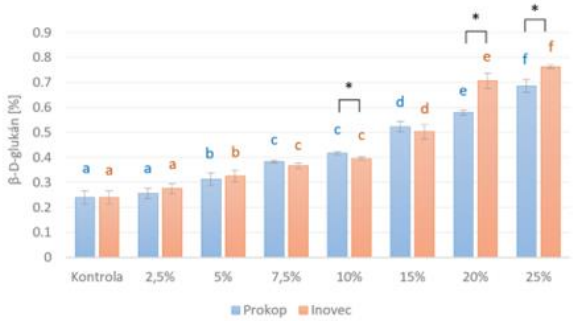
Z hľadiska senzorických vlastností sme po vyhodnotení nadobudli veľmi podobné dojmy ako pri knedliach pripravených zo zmesných múk z ovsa odrody Inovec. Knedle sú chuťovo veľmi porovnateľné s kontrolou, až na knedľu s 25 % obsahom ovsa, ktorá mala výrazne horkú dochuť.

Praskliny sme pozorovali v knedliach s 15 – 25 % obsahom ovsenej celozrnnej múky. Pšeničná múka síce obsahuje malé množstvo vlákniny, ale vyznačuje sa vysokým obsahom lepku, ktorý umožňuje vytvoriť stabilnú sieťovú štruktúru cesta [5]. Pridanie vyššieho množstva ovsenej celozrnnej múky do pšeničnej múky preto mohlo nariediť obsah lepku v nej a viesť k znehodnoteniu cesta, zníženiu jeho konzistencie [6] a k následným deformáciám v priebehu tepelnej úpravy.

2.3 Obsah β-D-glukánov v domácich parených kysnutých knedliach

V prípade knedle s prídavkom odrody Prokop bol obsah β-D-glukánov najnižší pri kontrolnej knedli (0,24 % ± 0,03) a najvyšší pri knedli s 25 % prídavkom ovsa (0,69 % ± 0,03). Pri prídavku odrody Inovec pozorujeme obdobný trend, že s pribúdajúcim obsahom ovsa v knedli narastá percentuálny obsah β-D-glukánov (Graf 2). Pozorovali sme, že pri knedliach s prídavkom ovsa 2,5 až 7,5 % a 15 % nie je pozorovaný žiaden

významný rozdiel v knedliach medzi dvoma rôznymi odrodami ovsa. Štatisticky významné rozdiely boli zaznamenané medzi odrodami pri knedliach s obsahom 10 % ovsa, kedy knedľa s prídavkom ovsa odrody Inovec mala nižší obsah β-D-glukánov ako odroda Prokop. Naopak pri prídavku ovsa 20 a 25 % sme zaznamenali štatisticky významný nárast obsahu β-D-glukánov v knedliach s prídavkom Inovca v porovnaní s knedľami s prídavkom odrody Prokop.

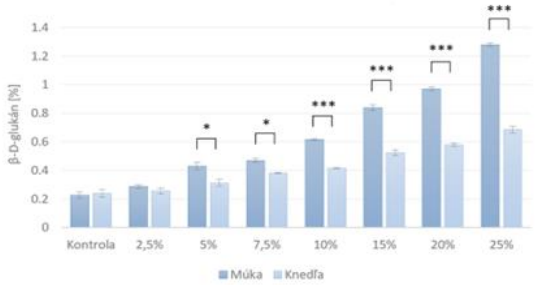


Graf 2 Štatistické vyhodnotenie obsahu β-D-glukánov v knedliach pripravených z odrôd Prokop a Inovec.
Vysvetlivky: Rozdielne písmená predstavujú štatisticky významný rozdiel (LSD, α = 0,05) a štatistika bola robená samostatne pre každú odrodu. Porovnanie obsahu β-D-glukánov medzi odrodou Prokop a Inovec v rámci každého variantu bola robená pomocou t-testu pri hladine významnosti *α = 0,05.

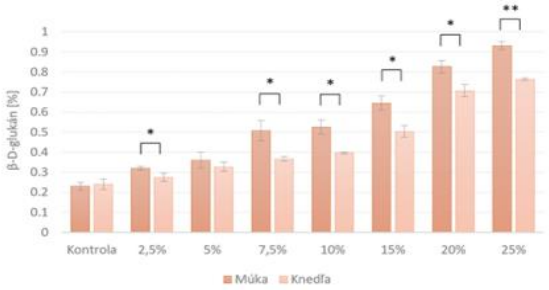
Zhodnotili sme v práci aj ako sa mení hladina β-D-glukánov medzi zmesnými múkami a výrobkom po technologickom spracovaní a tepelnej úprave, pričom výsledky sme vyhodnotili zvlášť pre obe použité ovsené odrody (Graf 3, Prokop a Graf 4, Inovec).

Pri odrode Prokop sme pozorovali štatisticky významný pokles v obsahu β-D-glukánov v knedli oproti zmesnej múke pri prídavku od 5 % vyššie vo všetkých ostatných prídavkoch. Pri prídavku 10 % a viac je pokles ešte zásadnejší ako pri prídavkoch 5 % a 7,5 %. Pri prídavku 2,5 % ovseného zrna je síce evidovaný pokles obsahu β-D-glukánov, ale nie je štatisticky preukazný (Graf 3).

Z výsledkov uvedených na Grafe 4 je evidentné, že pri prídavku odrody Inovec bol pozorovaný pokles hladiny β-D-glukánov v knedli v porovnaní so zmesnou múkou pri prídavkoch 2,5 % a potom od 7,5 % a vyššie vo všetkých ostatných prídavkoch, pričom najviac štatisticky preukazný rozdiel bol zaznamenaný pri prídavku 25 % ovsa. Pri prídavku 5 % ovsa je síce pozorovaný pokles obsahu β-D-glukánu, ale nie je štatisticky preukazný.



Graf 3 Štatistické porovnanie obsahu β-D-glukánov medzi zmesnou múkou a domácou parenou kysnutou knedľou s prídavkom ovsa siateho odrody Prokop.
Vysvetlivky: *α = 0,05, **α = 0,001, , ***α = 0,0001.



Graf 4 Štatistické porovnanie obsahu β-D-glukánov medzi zmesnou múkou a domácou parenou kysnutou knedľou s prídavkom ovsa odrody Inovec.
Vysvetlivky: *α = 0,05, **α = 0,001, , ***α = 0,0001.

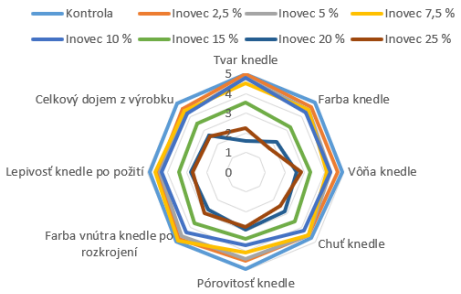
Ako je evidentné z výsledkov, technologickým spracovaním zmesných múk dochádza k miernemu poklesu hladiny β-D-glukánov vo finálnych výrobkoch aj napriek výraznej štruktúrnej stabilite polysacharidu. Počas technológie prípravy samotného produktu dochádza k niekoľkým procesom, ktoré môžu mať vplyv na pokles obsahu β-D-glukánov. Jedným z nich je kysnutie cesta. Nakoľko pri kysnutí cesta bolo použité pekárenské droždie obsahujúce kvasinkovú kultúru *Saccharomyces cerevisiae*, nemôžeme potvrdiť, že týmto procesom došlo k poklesu obsahu β-D-glukánov, keďže kvasinky nedokážu β-D-glukán utilizovať kvôli jeho β-glykozidickým väzbam a kvôli tomu, že sa prirodzene vyskytuje v ich bunkových stenách s cieľom udržiavať ich kompaktný tvar [7]. Procesom fermentácie je možné β-D-glukán spotrebovať vďaka napr. bakteriálnym kultúram mliečneho kvasenia *Lactobacillus plantarum*, ktoré preukázateľne rozkladajú β-štruktúru obilninového glukánu [8]. Ďalším významným procesom pri výrobe knedle je tepelná úprava. Porovnaním našich výsledkov s

literárnymi zdrojmi existuje predpoklad, že vplyvom tepelného spracovania môže dôjsť k miernemu poklesu hladiny β-D-glukánov v dôsledku jeho degradácie na fragmenty s nízkou molekulovou hmotnosťou alebo depolymerizácie jeho lineárnej štruktúry [9,10]. Jedným z dôvodov nižšieho obsahu β-D-glukánov v knedliach oproti zmesným múkam môže byť prítomnosť endogénnych β-glukanáz v pšeničnej alebo ovsenej celozrnnej múke, ktoré počas skladovania múk mohli mierne rozložiť reťazec β-D-glukánu a tým znížiť jeho obsah vo finálnom výrobku [11].

2.4 Senzorické hodnotenie domácich parených kysnutých knedieľ pomocou bodovej stupnice

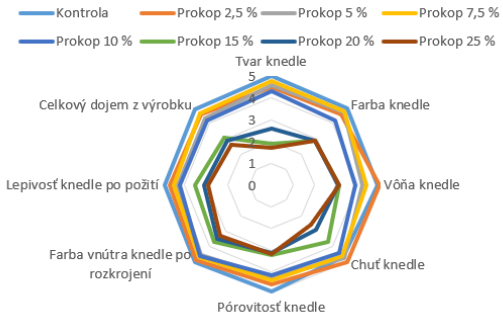
Pri všetkých výrobkoch bolo hodnotených 7 senzorických parametrov a taktiež celkový dojem zo samotného výrobku bodmi od 1 do 5, pričom vysvetlivky k bodovému hodnoteniu sú uvedené v Tabuľke 1. Bodovanie všetkých hodnotiacich pre každý parameter a pre každú hodnotenú vzorku sme spriemerovali a graficky vyhodnotili do podoby radarových grafov (Graf 5, Graf 6).

Najlepšie celkové hodnotenie dosiahla knedľa pripravená z kontrolnej múky. Knedle z ovsených múk s prídavkom od 2,5 do 10 % ovsa Inovec získali v bodovom hodnotení síce nižšie, ale porovnateľné výsledky. Výrazný pokles celkového počtu bodov nastal až pri knedle s 15 % prídavkom ovsa. Najnižší počet bodov mali knedle zo zmesných múk s 20 % a 25 % prídavkom ovsa siateho. Na základe týchto výsledkov môžeme tvrdiť, že prídavok ovsa do zmesnej múky na úrovni 15 % a viac je zo senzorického hľadiska nevhodný pre konečného spotrebiteľa (Graf 5).



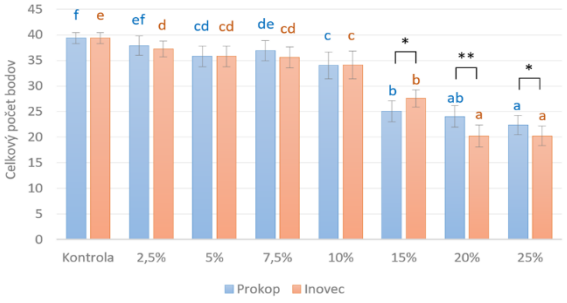
Graf 5 Celkové výsledky senzorického bodového hodnotenia knedieľ s 2,5 – 25 % prídavkom ovsenej múky z odrody Inovec.

Knedle pripravené z ovsených múk s prídavkom od 2,5 do 10 % ovsa odrody Prokop získali v hodnotení nižší počet bodov ako kontrolná vzorka, ale z pohľadu senzorických vlastností sú s ňou veľmi porovnateľné. V prípade odrody Prokop sme nepozorovali so zvyšujúcim prídavkom ovsa klesajúcu tendenciu bodovania, keďže knedľa s prídavkom na úrovni 7,5 % dosiahla mierne lepšie výsledky ako knedľa s 5 % prídavkom. Zásadný pokles získaných hodnotiacich bodov sme pozorovali až pri knedli s 15 % obsahom ovsa, pričom so zvyšujúcou hladinou ovsa sa aj celkové hodnotenie znižuje (Graf 6).



Graf 6 Celkové výsledky senzorického bodového hodnotenia knedieľ s 2,5 – 25 % prídavkom ovsenej múky z odrody Prokop.

Výsledky bodového hodnotenia sme vyhodnotili aj štatisticky (Graf 7). Pri knedliach pripravených zo zmesných múk s obsahom 2,5 % až 10 % ovsa odrôd Prokop a Inovec nie je preukazný štatistický rozdiel medzi oboma odrodami z hľadiska ich senzorických vlastností v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Štatistické rozdiely sú viditeľné až pri prídavku ovsa na úrovni 15 % až 25 %, pričom najviditeľnejší štatistický rozdiel sme zaznamenali pri prídavku ovsa na úrovni 20 %.



Graf 7 Štatistické vyhodnotenie celkového počtu bodov analyzovaných knedieľ po bodovom hodnotení. **Vysvetlivky:** Rozdielne malé písmená v rámci každej odrody predstavujú štatisticky významný rozdiel (LSD, α = 0,05) a štatistika bola robená samostatne pre každú odrodu. Porovnanie celkových bodov medzi odrodou Prokop a Inovec v rámci každého variantu

bolo robené pomocou t-testu pri hladine významnosti *α = 0,05, **α = 0,001.

Záver

Celozrnnú ovsenú múku, ako zdroj β-D-glukánov, sme získali pomletím odplevnených zŕn plevnatej odrody ovsa siateho Prokop a zŕn nahej odrody Inovec. Ovsenú múku sme využili na prípravu tzv. zmesných múk s prídavkom 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25 % ku kontrolnej pšeničnej polohrubej múke. V zmesných múkach pripravených z odrody Prokop (0,23 – 1,28 %) sme pozorovali vyššie hodnoty β-D-glukánov ako z odrody Inovec (0,23 – 0,93 %). Prídavok ovsa v každom prípade obohacuje pšeničnú múku o zdraviu prospešné β-D-glukány.

Prípravou finálnych produktov, domácich parených kysnutých knedieľ, sme dokázali, že vplyvom spracovania múky, kysnutia a tepelnej úpravy dochádza k poklesu hladiny β-D-glukánov v porovnaní so zmesnými múkami, pričom k väčšiemu poklesu došlo pri knedliach pripravených použitím odrody Prokop (0,24 – 0,69 %) ako odrody Inovec (0,24 – 0,76 %).

Analýzou senzorického hodnotenia finálnych výrobkov sme zistili, že knedľa pripravená z kontrolnej pšeničnej múky síce dosahuje najlepšie výsledky, avšak knedle s obsahom ovsa do 10 % sa vyznačujú veľmi porovnateľnou kvalitou a zároveň vyšším obsahom biologicky aktívnych a funkčných β-D-glukánov. Finálne výrobky s prídavkom ovsenej múky na úrovni 15 – 25 % sú pre finálneho konzumenta senzoricky neprijateľné.

Poďakovanie

Touto cestou by som chcel poďakovať školiteľke doc. RNDr. Michaele Havrlentovej, PhD. za podporu a prejavenú dôveru pri vypracovaní celej tejto práce a za všetky rady a pripomienky. Poďakovanie takisto patrí Národnému poľnohospodárskemu a potravinárskemu centru – Výskumnému ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch a Hotelovej akadémii Ľudovíta Wintera v Piešťanoch za možnosť využitia ich priestorov a materiálov počas experimentálnej časti tejto práce. Ďakujem tiež Ing. Petrovi Hozlárovi, PhD. z Výskumno-šľachtiteľskej stanice Vígľaš-Pstruša za vypestovanie a dodanie vzoriek ovsa siateho.

Použitá literatúra

[1] TIWARI, U. – CUMMINS, E. 2009. Factors influencing β-glucan levels and molecular weight in cereal-based products. In: Cereal Chemistry, roč. 86, č. 3, s. 290-301. ISSN 0009-0352.

[2] MÄKELÄ, N. a kol. 2017. Gelation of cereal β-glucan at low concentrations. In: Food Hydrocolloids, roč. 73, s. 60-66. ISSN 1873-7137.

[3] AHMAD, A. – KALEEM, M. 2018. Chapter 11 - β-glucan as a food ingredient. In: GRUMEZESCU, A. M. – HOLBAN, A. M. ed. Biopolymers for food design. Academic Press, s. 351-381. ISBN 978-0-12-811449-0.

[4] LIU, F. a kol. 2021. HACCP certification in food industry: Trade-offs in product safety and firm performance. In: International Journal of Production Economics, roč. 231, 107838. ISSN 1873-7579.

[5] YE, L. a kol. 2023. The role of gluten in food products and dietary restriction: Exploring the potential for restoring immune tolerance. In: *Foods*, roč. 12, č. 22. ISSN 2304-8158.

[6] LI, Z. a kol. 2023. Mechanism underlying the weakening effect of β-glucan on the gluten system. In: *Food Chemistry*, roč. 420, 136002. ISSN 1873-7072.

[7] KUSMIATI – RIZKY DHEWANTARA, F. X. 2016. Cholesterol-lowering effect of beta glucan extracted from Saccharomyces cerevisiae in rats. In: Scientia Pharmaceutica, roč. 84, č. 1, s. 153-165. ISSN 2218-0532.

[8] LU, J. a kol. 2018. Effect of fermentation on content, molecule weight distribution and viscosity of β-glucans in oat sourdough. In: International Journal of Food Science & Technology, roč. 54, č. 1, s. 62-67. ISSN 1365-2621.

[9] OLIVEIRA, L. a kol. 2012. Effect of drying temperature on quality of β-glucan in white oat grains. In: Ciencia y tecnologia de alimentos, roč. 32, č. 4, s. 793-797. ISSN 0101-2061.

[10] BAI, Y. a kol. 2021. Effect of thermal processing on the molecular, structural, and antioxidant characteristics of highland barley β-glucan. In: Carbohydrate Polymers, roč. 271, 118416. ISSN 0144-8617.

[11] ANDERSSON, A. A. M. a kol. 2004. Molecular weight and structure of (1→3)(1→4)-β-D-glucan preparations isolated from Finnish oat varieties. In: Food Hydrocolloids, roč. 5, s. 513-522. ISSN 0268-005X.

Porovnanie metód spracovania krvi plazov na laboratórne vyšetrenie

Comparison of reptilian blood smear preparation methods for laboratory analysis

Veronika Komárňanská[1] – Janka Schlarmannová[2] – Róbert Kirchner[3]
Školiteľ: Janka Schlarmannová[2]
[1,2] Katedra zoológie a antropológie, FPVaI UKF, Nábrežie mládeže 91, 949 01 Nitra
[3] Ústav chovu zvierat, FAPZ SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra
[1]veronika.komarnanska@student.ukf.sk, [2]jschlarmannova@ukf.sk, [3]robert.kirchner@uniag.sk

Abstrakt
Laboratórne vyšetrenie krvi je dobrým ukazovateľom klinického stavu zvieraťa. Automatické hematologické prístroje využívané v súčasnosti nie sú schopné analyzovať krv plazov ani vtákov z dôvodu prítomnosti jadier v erytrocytoch, takže krvné analýzy sa vykonávajú pomocou sledovania krvných náterov pod mikroskopom. V našej práci sme ako modelové zvieratá vybrali 3 druhy jašterov: agama bradatá (*Pogona vitticeps*), leguán zelený (*Iguana iguana*), varan mangrový (*Varanus indicus*). Odber krvi sme realizovali u všetkých druhov z ventrálnej chvostovej žily *(vena coccygea ventralis*). Cieľom našej práce bolo stanovenie najvhodnejšej metódy spracovania krvi na mikroskopické vyšetrenie. Pri tvorbe náterov sme testovali niekoľko typov farbenia s použitím antikoagulantu ako aj bez jeho použitia. Pomocou pipety sme naniesli 6 µl krvi na podložné sklíčko a pod uhlom približne 35° sme rozotreli kvapku krvi na podložnom sklíčku. V rámci práce sme využili 3 typy farbení: Hemacolor ®, Wright, Wright-Giemsa. Na základe našich výsledkov z jednotlivých metodických postupov sa dá zhodnotiť, že najvhodnejšou metódou farbenia pre krvné bunky plazov bolo farbenie Wright Giemsa.

Kľúčové slová: krv, krvné elementy, jaštery, plazy

Abstract
Laboratory blood analysis is a good diagnostic method of clinical health evaluation of an animal. Automatic hematology machines are unable to analyse blood of non-mammalian animals because their erythrocytes contain a nucleus. Blood analysis within these groups is done by manual blood smear microscopy. In our research we chose three species of lizards as our model species. We chose the bearded dragon (*Pogona vitticeps*), the green iguana (*Iguana iguana*) and the Western pacific monitor (*Varanus indicus*) . In all three species the blood was drawm from the ventral coccygeal vein (*Vena coccygea ventralis*). The objective of our research was to determine the best method of blood evaluation .When making the blood smears we tested three commonly used methods of blood staining: Hemacolor, Wright, Wright-Giemsa with and without an anticoagulant. Our analysis determined that the best method od blood staining was the Wright-Giemsa method without an anticoagulant.

Key words: blood , blood elements, Lizards, Reptiles

Úvod
Zachovanie biodiverzity je nevyhnutnosťou pre zachovanie foriem života na Zemi. Zánik ktorejkoľvek časti ekosystému má negatívny dopad na mnohé procesy a systémy [1]. Šupinaté plazy (Squamata) zahŕňajú viac ako 10 000 recentných druhov a stovky známych vyhynutých druhov, ktoré sú jednou zo základných zložiek ekosystémov na celom svete dnes, aj v dávnej minulosti. Jaštery sa diverzifikovali počas svojho fylogenetického vývoja na základe environmentálnych faktorov. Napriek našim rastúcim poznatkom o modernej diverzite a ekológii jašterov a hadov nebolo známe takmer nič o ich pôvode a najskorších štádiách ich vývoja. Morfologické údaje až doteraz vždy naznačovali, že infrarad Iguania (leguány a chameleóny) bol najstaršou modernou líniou jašterov, ktorá sa vyvinula. Molekulárne dôkazy dnešných štúdií však ukazujú, že gekóny sa vyvíjali z radu Squamata najskôr a leguány v rámci tohto evolučného radu sú umiestnené hlbšie do vnútra fylogenetického stromu. Odhady o čase vzniku hlavných skupín plazov naznačujú oveľa starší pôvod týchto línií, než sa predtým predpokladalo: pred masovým vyhynutím permsko-triasového obdobia

pred 252 miliónmi rokov [2]. Krv je základná súčasť vnútorného prostredia každého organizmu na vyššom fylogenetickom stupni vývoja. Cirkuluje v krvnom obehu, kardiovaskulárnom systéme, a tým zabezpečuje vzájomné prepojenie všetky častí tela [3-4]. Krv v organizme plní veľa funkcií, medzi ktoré patria napr. transport kyslíka a živín k telovým orgánom a tkanivám, transport odpadových metabolických produktov pomocou krvi do vylučovacích orgánov (obličky), zabezpečuje prenos hormónov a iných dôležitých látok (napr. enzýmy) k špecifickým tkanivám, podieľa sa na termoregulácii organizmu, homoiotermii – udržiavanie stálej teploty a taktiež rozvádza teplo, pomocou bielych krviniek zabezpečuje ochranu organizmu pred cudzorodými, toxickými látkami pred toxínmi a patogénmi, udržiavaním izohydrie, izoosmie a izoiónie pomáha regulovať homeostázu a taktiež pomáha regulovať a udržiavať tlak krvi svojím objemom, podporuje stabilitu pH v organizme, pomocou reakcií na zrážanie krvi sa podieľa na zabraňovaní strát živín z ciev v prípade ich poškodenia, prípadne z iných poškodených miest, pomáha pri prenose plynov, ktorých úlohou je prenos kyslíka z pľúc do tkanív a naopak odvod CO 2 z tkanív do pľúc, transportuje všetky potrebné živiny absorbované v procese trávenia a sú uvoľňované zo zásob v pečeni a tukovom tkanive [3, 5-8]. Doneley a kol. [9] uvádzajú, že normálny objem krvi u plazov je približne 5 – 8% telesnej hmotnosti. Hematologické vyšetrenia sú v rámci veterinárnej medicíny bežnou diagnostickou praxou využívanou na stanovenie klinického obrazu. Erytrocyty sú oválne jadrové bunky, ktorých veľkosť závisí od daného druhu, ale aj v rámci daného druhu môže byť ich veľkosť veľmi variabilná [10]. Erytrocyty plazov sú štruktúrnou a aj mikroskopickou stavbou podobne iným necicavčím stavovcom. Pri farbení Romanowskym typom farbiva sú dospelé štádiá erytrocytov oválneho tvaru a majú pomerne veľké množstvo ružovo oranžovej cytoplazmy. Jadrá tohto typu buniek bývajú nepravidelného až oválneho tvaru v závislosti od druhu. V krvi plazov sledujme okrem dospelých štádií erytrocytov aj iné vývinové štádiá ako sú erytroplatidy (staré bunky) retikulocyty (mladé bunky) a rubricyty, ktoré veľmi pripomínajú lymfocyty plazov a treba ich pri tvorbe krvného obrazu korektne identifikovať [11]. Jaštery majú z plazov veľkosť červených krviniek najmenšiu, a naopak ich koncentráciu v krvi najväčšiu. Leukocyty plazov sa dajú klasifikovať ako granulocyty (heterofily, eozinofily, bazofily) a agranulocyty (lymfocyty, monocyty, azurofily). Existuje množstvo manuálnych metód na stanovenie a analýzu krvných elementov v zložke krvi, avšak neexistuje metóda, ktorá by bola spoľahlivá pri všetkých druhoch plazov [12]. Leukocyty sa rozlišujú podľa počtu a morfológie granúl, reakcií na farbivá, relatívnej koncentrácie v periférnej krvi a všetky tieto faktory sú rodovo, ale aj druhovo špecifické. Platí, že heterofily (pomenované kvôli ich jasne ružovo-oranžovým cytoplazmatickým granulám) sú ekvivalentom cicavčích neutrofilov, zatiaľ čo monocyty a lymfocyty plazov majú podobnú morfológiu a funkciu ako u cicavcov, vtákov a rýb. Azurofily sú jedinečné pre konkrétne druhy plazov [11]. Na venepunkciu (odber krvi) u jašterov sú zvyčajne potrební dvaja ľudia. Jedna osoba zviera fixuje, druhá osoba odoberá vzorku. U veľkých alebo ťažko zvládnuteľných jedincov môže byť potrebná sedácia [13]. Najlepšie miesto vpichu žily sa líši podľa druhu a ideálne miesto sa môže pohybovať v úrovni medzi 20 % až 80 % dĺžky chvosta. Ak sa pokúsime o venepunkciu príliš blízko kloaky, existuje riziko prepichnutia hemipenisov u samcov jašterov a taktiež sa môže vyskytnúť aj lymfatická kontaminácia [14].

1 Materiál a metodika

Na získanie vzoriek krvi boli použité zvieratá zo schváleného chovného zariadenia na Chov plazov a nebezpečných zvierat podľa Vyhlášky 143/2012 Z.z. o chove nebezpečných zvierat Ústavu chovu zvierat Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre. Analyzovali sme vzorky odobrané 3 druhom z podradu: jaštery (Sauria): leguán zelený (*Iguana iguana*), agama bradatá (*Pogona vitticeps*) a varan mangrový (*Varanus indicus*).

1.1 Odber a spracovanie vzoriek

Odber krvi sme realizovali u všetkých druhov z ventrálnej chvostovej žily (*vena coccygea ventralis*) podľa [14], ktorý odporúča ako najvhodnejšie miesto vpichu pri odbere z chvostovej žily úroveň v jednej štvrtine dĺžky chvosta. Odber sme realizovali v laboratóriu Celulárnych a subcelulárnych štruktúr SPU v Nitre na Ústave aplikovanej biológie, injekčnou ihlou s rozmermi od 0,5 do 0,9 x 25 mm v závislosti od veľkosti konkrétneho jedinca. Chvostová žila je prístupná buď ventrálne alebo laterálne [15]. My sme pri odbere zvolili odber z ventrálnej strany. Nevýhody tohto miesta spočívajú v tom, že žila môže byť ľahko roztrhnutá a existuje riziko tvorby hematómu, pretože po venepunkcii nie je možné ľahko aplikovať tlak [16]. Pri odbere krvi je z bezpečnostných dôvodov dôležité zviera zafixovať. Jaštery fixujeme rukami, hrudníkové

končatiny fixujeme pritlačením lakťovej oblasti laterálne ku hrudnému košu, zatiaľ čo panvové končatiny držíme vystreté a kolennú časť pritláčame k laterálnym plochám chvosta. Fixácia je obzvlášť dôležitá pri veľkých druhoch jašterov ako sú varany a leguány, ktoré majú v stresových situáciách tendenciu brániť sa pazúrmi alebo švihaním chvosta. Ak sa použije napichnutie chvostovej žily u druhu so schopnosťou zhodiť chvost, riziko možno minimalizovať dôsledným sledovaním chvosta a prerušením zákroku, ak sa spozoruje trhanie chvostom. Injekčnú ihlu s rozmermi od 0,5 do 0,9 x 25 mm v závislosti od veľkosti konkrétneho jedinca zavedieme do žily z ventrálnej strany v 40 stupňovom uhle. Ihlu vedieme pod šupinu, nikdy nie do šupiny. V prípade, že je zviera vo veľkom strese, sa môže stať, že nastane kontrakcia svalov, ktorá zabráni prietoku krvi do striekačky. V prípade potreby je možné na zatvorené viečka umiestniť vatové tampóny a zaistiť ich elastickým obväzom okolo hlavy. Táto obmedzovacia technika upokojuje zviera bez použitia chemického utlmovania. Krv sme po odbere nemiešali s antikoagulantom nakoľko Perpinan [17] odporúča pri odbere krvi plazov na hematologické vyšetrenia a krvné nátery používať krv bez antikoagulačného činidla. Krvný náter sme vyhotovili pomocou posuvnej (kĺzavej) metódy. Pred náterom sme dôkladne alkoholom vyčistili podložné sklíčka a pomocou pipety sme naniesli 6 µl krvi na podložné sklíčko a pod uhlom približne 35° sme rozotreli kvapku krvi na podložné sklíčko.

1.2 Farbenie preparátov

Hemacolor ® je farbiaca sada pre mikroskopiu a používa sa na diagnostiku medicínskych buniek a slúži na hematologické a klinicko-cytologické vyšetrenie materiálu vzorky. Je to súprava na farbenie pripravená na použitie, ktorá pri použití spolu s ďalšími diagnostickými produktami in vitro umožňuje vyhodnotiť cieľové štruktúry na diagnostické účely (fixáciou, farbením, kontrastným farbením v prípade potreby upevnenie) v hematologických a klinicko-cytologických materiáloch na vzorky, napríklad v náteroch z plnej krvi a kostnej drene. Hemacolor® sa používa na rýchle farbenie hematologických a klinicko-cytologických vzoriek materiálu, aby sa vytvorilo farbenie, ktoré zodpovedá Pappenheimovmu farbeniu, skrátenie klasickej metódy farbenia na čas farbenia 2 minúty. Nefarbené štruktúry majú relatívne nízky kontrast a je extrémne ťažké ich rozlíšiť pod svetelným mikroskopom. Farbenie s Hemacolor® poskytuje výsledok farbenia, ktorý zodpovedá Pappenheimovmu farbeniu s prevažne purpurovo zafarbenými jadrami. Toto je založené na molekulárnej interakcii farbiva Eozín Y a komplexu Azur B s DNA. Obe farbivá sa zostavujú do komplexu Eozín Y – Azur BDNA a intenzita výslednej škvrny závisí od obsahu Azur B a pomeru Azur B : Eosin Y. Ďalej sa škvrna vo výsledku môže líšiť v závislosti od vplyvu fixácie, času farbenia, hodnoty pH roztokov alebo tlmivých látok. Použitím pufrovaných roztokov s pH 7,2 v súprave na farbenie Hemacolor® je zabezpečená vysoká stabilita škvrny a čisté výsledky farbenia bez vyzrážania. Príprava činidla 1, 2 a 3 z Hemacolor® Rapid farbenia krvného náteru sú pripravené na použitie ihneď, akékoľvek riedenie nie je potrebné a môže spôsobiť iba zhoršenie stavu a nepresnosť výsledku farbenia a jeho stabilitu [18].

Wrightovo farbenie je typ farbenia podľa Romanowského, ktorý sa bežne používa v hematologickom laboratóriu na rutinné farbenie náterov periférnej krvi. Používa sa aj na farbenie aspirátov kostnej drene, vzoriek moču a na preukázanie malarických parazitov v krvných náteroch [19]. Wrightovo farbenie je pomenované po Jamesovi Homerovi Wrightovi, ktorý dané farbenie zhotovil v roku 1902 na základe modifikácie Romanowského farbenia. Farbivom sa ľahko rozlišujú typy krvných buniek, a preto sa stalo bežne používaným na vykonávanie diferenciálnych počtov WBC a hodnotenie morfológie krvných buniek [18].

V hematológii sú polychromatické Romanowského farbivá štandardom pre krvné nátery a farbenie kostnej drene. Rôzne druhy Romanowského farbív (Giemsa, MayGruenwald, Leishman, Wright, Wright-Giemsa, Jenner) obsahujú rôzne pomery činidla metylénovej modrej, katiónovej zložky (a tiazínové farbivá súvisiace s činidlom, ako je azúr B) a eozínu Y, aniónovej zložky. Interakcia katiónových a aniónových zložiek vytvára dobre známy Romanowsky efekt, ktorý nemožno dosiahnuť, ak sa každý komponent používa samostatne. Intenzita farbenia závisí od obsahu azúru B, ako aj od pomeru azúru B k eozínu Y, pričom výsledok farbenia ovplyvňuje niekoľko ďalších faktorov: hodnota pH pracovného roztoku a tlmivý roztok, spôsob fixácie a doba expozície farbiva. Na odlíšenie sa používa riešenie Wright-Giemsa od BioGnost jadrová a/alebo cytoplazmatická morfológia trombocytov, erytrocytov a lymfocytov v krvnom nátere alebo aspirátoch kostnej drene [19]. Farbivá Wright-Giemsa sú zmesi základných farbív (metylénová modrá), ktoré sa farbia do modra, a kyslých farbív (eozín), ktoré sa farbia do červena. „Kyslé“ zložky bunky (jadro, cytoplazmatická RNA, bazofilné granuly) sa teda farbia na modro alebo fialovo

a základné komponenty bunky (hemoglobín, eozinofilné granuly) sa farbia na červeno alebo oranžovo [20].

1.3.1 Hodnotenie preparátov

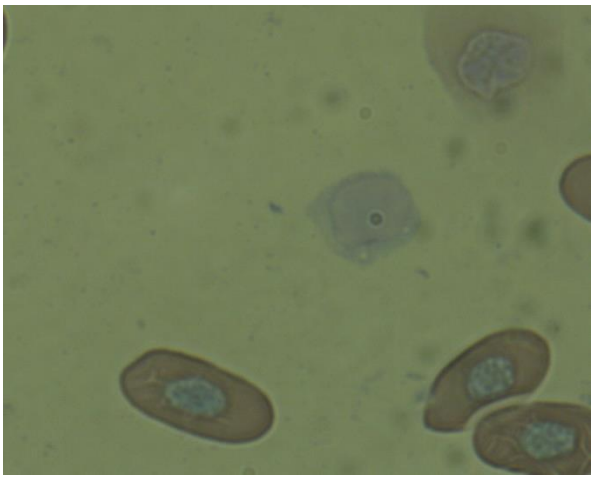
Cieľom našej práce bola identifikácia najvhodnejšej metódy spracovania krvi na mikroskopické vyšetrenie. Výsledky sme stanovovali na základe kritérií, ktorými bola intenzita zafarbenia, rýchlosť farbenia, schopnosť identifikovať jednotlivé typy krvných buniek a reakcia buniek na farbivo.

2 Výsledky a diskusia

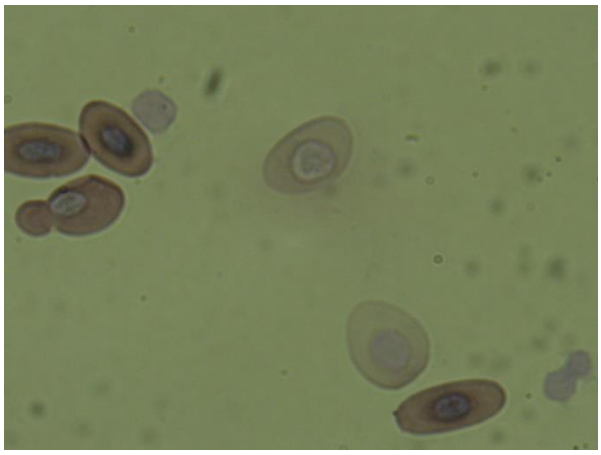
V nasledovných podkapitolách si popíšeme dosiahnuté výsledky a porovnáme ich medzi sebou.

2.1 Hemacolor

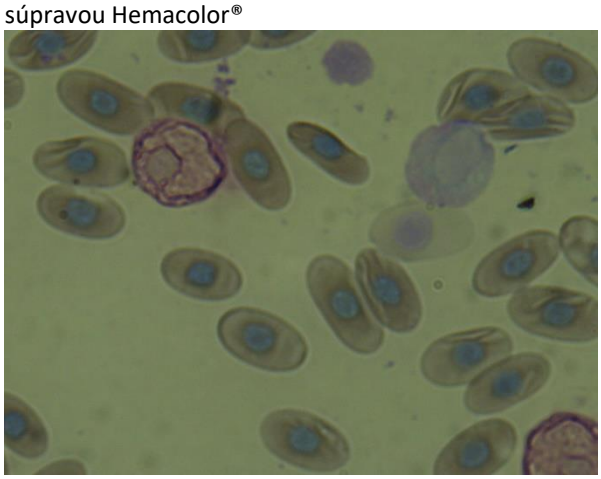
Na obrázkoch č. 1 až č. 3 je vidieť zafarbenie jednotlivých buniek vybraných druhov plazov farbiacou súpravou Hemacolor®. Z uvedeného výsledku je zrejmé nedostatočné zafarbenie pre účely diferenciácie jednotlivých buniek.



Obr 1. Krvné bunky leguána zeleného farbené farbiacou súpravou Hemacolor®



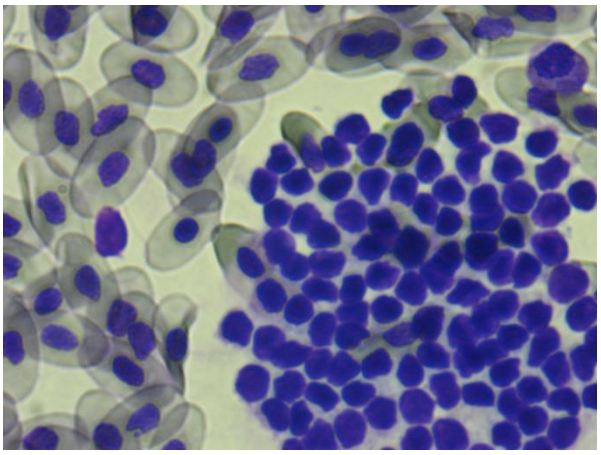
Obr. 2 Krvné bunky agamy bradatej farbené farbiacou súpravou Hemacolor®



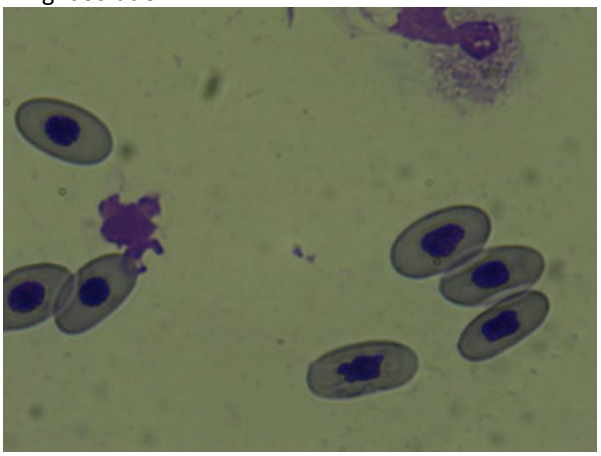
Obr. 3. Krvné bunky varana mangrového farbené farbiacou súpravou Hemacolor®

2.2. Wright solution

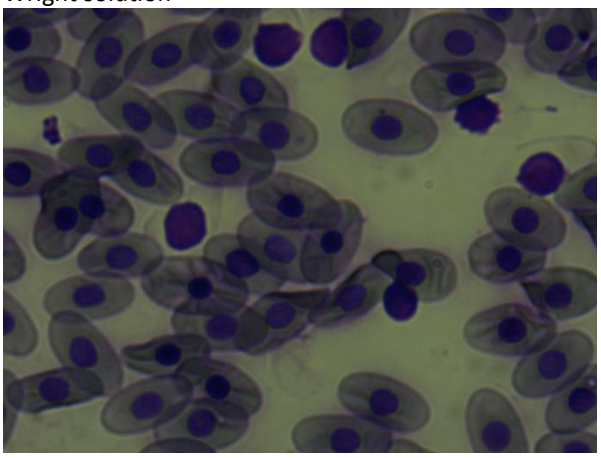
Na obrázkoch č. 4 až č. 6 je vidieť zafarbenie jednotlivých buniek vybraných druhov plazov pomocou Wright solution. Na obrázkoch sú výrazne lepšie zafarbené erytrocyty v porovnaní so zafarbenými erytrocytmi na obr. č. 1 až č.3.



Obr. 4 Krvné bunky agamy bradatej farbené pomocou Wright solution



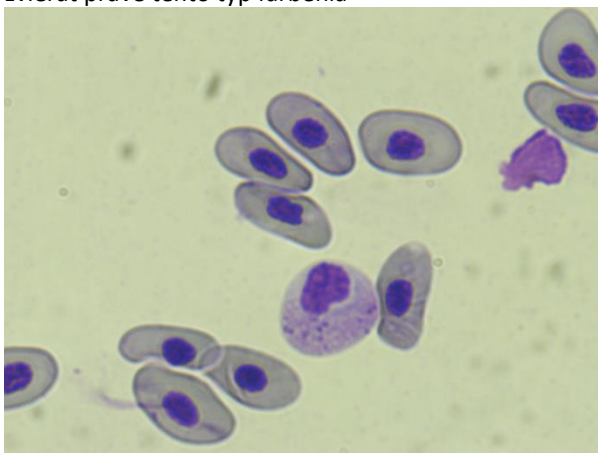
Obr.5 Krvné bunky leguána zeleného farbené pomocou Wright solution



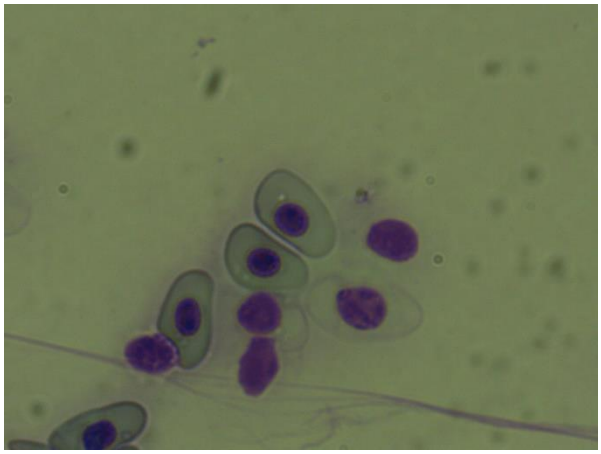
Obr.6. Krvné bunky varana mangrového farbené pomocou Wright solution

2.3. Wright-Giemsa

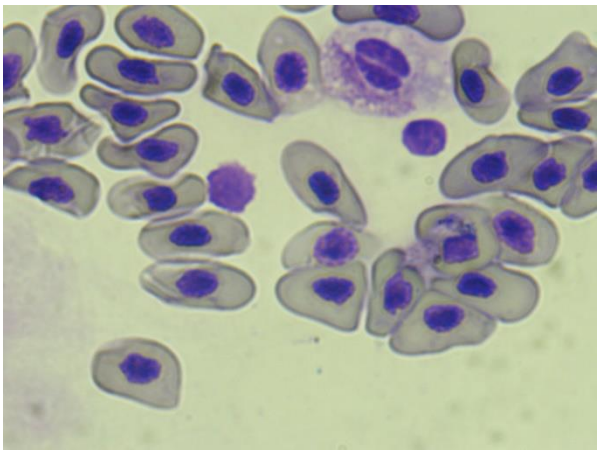
Na obrázkoch č. 7 až č. 9 je vidieť zafarbenie jednotlivých buniek vybraných druhov plazov pomocou Wright Giemsa. Na obrázkoch sú výrazne lepšie identifikovateľné jednotlivé krvné elementy, z čoho vyplýva ako najvhodnejší typ v rámci sledovaných zvierat práve tento typ farbenia



Obr.7. Krvné bunky agamy bradatej farbené metódou Wright-Giemsa

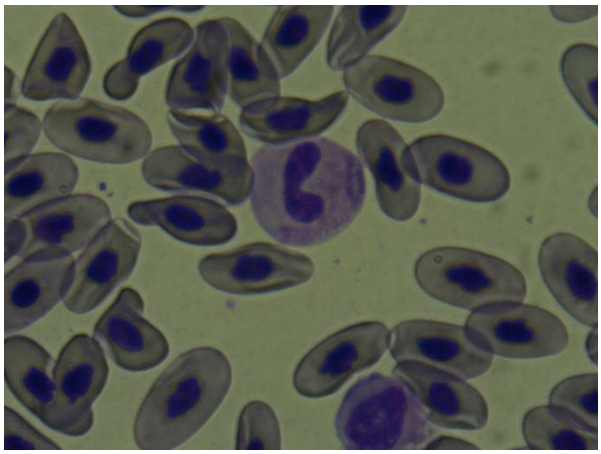


Obr. 8. Krvné bunky varana mangrového farbené metódou Wright-Giemsa



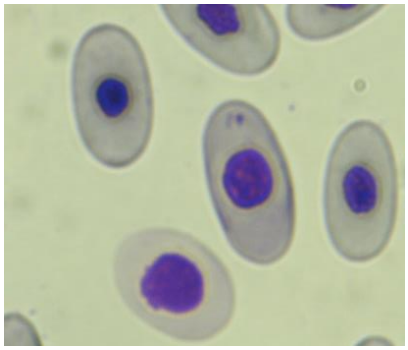
Obr. 9. Krvné bunky leguána zeleného farbené pomocou metódy Wright-Giemsa

Perpinan [17] opisuje farbenie krvných elementov korytnačiek pomocou Giemsa, MayGrünwald-Giemsa, Wright, Wright-Giemsa, pričom opisuje že tieto metódy poskytujú lepšie výsledky farbenia ako rýchle Diff-Quik, Rapi-Diff alebo podobné metódy. Toto potvrdzujú aj naše výsledky jednotlivých farbení pre podrad jašterov *(Sauria)*. Gracikova [22] použila na farbenie krvných elementov vodných korytnačiek farbenie Hemacolor®, ktoré je modifikované na cicavčie krvné bunky. Vo výsledkoch uvádza problém pri určovaní jednotlivých typov krvných elementov, s čím súhlasíme aj v rámci našich záverov v rámci podradu jašterov. Z uvedených výsledkov preto vyplýva, že najvhodnejším spôsobom pre farbenie buniek plazov je kombinácia Wright Giemsa. Perpinan [17] vo svojej práci odporúča pri odbere krvi plazov pre účely hematologického vyšetrenia a spracovania krvných náterov používať krv bez antikoagulačného činidla, z dôvodu minimalizovania akýchkoľvek zmien v morfológii buniek a zabráneniu interferencii v krvnom nátere. Preparáty zhotovené zo vzoriek s veľmi nízkymi hodnotami hematokritu (zvyčajne z dôvodu hemodilúcie) majú tendenciu mať nízku kvalitu. S týmto tvrdením sa plne stotožňujeme, pretože v rámci našej práce sme prvý odber vykonali s použitím antikoagulačného činidla EDTA, ktoré spôsobilo zmršťovanie erytrocytov a ich následnú deformáciu (obr. 10).



Obr. 10 Deformácie erytrocytov leguána zeleného spôsobené antikoagulačným činidlom EDTA

Pre porovnanie na obrázku č. 11 vidíte erytrocyty toho istého jedinca bez využitia antikoagulačného činidla EDTA.



Obr. 11 Erytrocyty bez použitia antikoagulačného činidla

Záver

Na základe našich pozorovaní jednotlivých metodických postupov sa dá zhodnotiť, že najvhodnejšou metódou farbenia pre krvné bunky plazov bolo farbenie Wright Giemsa, pretože sme pri ňom dosahovali optimálne zafarbené jednotlivé krvné bunky, a z toho dôvodu bola identifikácia typov buniek ľahšia. Pri farbení pomocou farbiaceho setu Hemacolor® sme pozorovali slabé zafarbenie pozorovaných buniek, čím bola identifikácia leukocytov náročnejšia, v niektorých prípadoch až nemožná. Pri farbení podľa Wrighta boli naše výsledky v porovnaní so setom Hemacolor® lepšie, avšak malo silnejšiu intenzitu zafarbenia ako Wright Giemsa, čo viedlo k výrazne tmavšiemu zafarbeniu niektorých krvných buniek u vybraných druhov plazov, a tým to znížilo možnosti identifikácie jednotlivých typov krvných elementov.

Použitá literatúra

[1] KIRCHNER, R. et. al. 2023 Biogenic Elements and Heavy Metals in Hermann's Tortoises—Testudo hermanni: Effect on Serum Biochemistry and Oxidative Status Parameters. Animals. 2023; 13(13):2218. https://doi.org/10.3390/ani13132218

[2] SIMÕES, T.R. et al. 2018. The origin of squamates revealed by a Middle Triassic lizard from the Italian Alps. Nature 557, 706-709. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0093-3

[3] KOVÁČIK, J. et al.2015. Fyziológia živočíchov. 1. vyd., Slovenská poľnohospodárska univerzita: Nitra, 414 s. ISBN 978-80-552-1290-6

[4] CSANDY, A. 2021. Výkladový a obrázkový slovník z morfológie živočíchov. Prešovská univerzita v Prešove. 2021, s. 13. ISBN 978-80-555-2748-2

[5] CALKOVSKÁ, A. 2017. Fyziológia človeka pre nelekárske študijné odbory. 2. vyd., Bratislava: Osveta. 2017, 220 s. ISBN 978-80-8063-455-1

[6] BABINSKA, K. 2018. Fyziológia krvi. Bratislava: Fyziologický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského, 2018, 116 s. [online] [cit. 2022-06-23] doi: https://zona.fmed.uniba.sk/fileadmin/lf/sucasti/Teoreticke_ustavy/Fyziologicky_ustav/Fyziologia_krvi_1819_web.pdf

[7] ZIMA, J. et al. 2018. Zoologie obratovců. 2. vyd., Academia: nakladatelství. 2018, 696 s. ISBN 978-80-2002-702-3

[8] MARTINI, F. et al. 2018. Human Anatomy. 9. vyd., USA: Benjamin Cummings Publishing. 884 s. ISBN 10: 0-13-432076

[9] DONELEY, B. et al.2018. Reptile medicine and surgery in clinical practice. 1. vyd., John Wiley & Sons Ltd., 2018, 500 s. ISBN 9781118977682

[10] VERGNER, I. 2001. Ještěři. Jihlava: Nakladatelství MADAGASKAR. 462 s. ISBN 80-86068-23-4

[11] STACY, I. et al.2018. Diagnostic Hematology of Reptiles, [online] [cit.2023-03-04] doi:http://seaturtle.org/PDF/StacyNI_2011_ClinLabMed.pdf

[12] WHITMORE, E. et al. 024. Analytical Variability and Agreement of Leukocyte Quantification Methods in Inland Bearded Dragons (Pogona vitticeps). Journal of Herpetological Medicine and Surgery. 10.5818/JHMS-D-22-00047.

[13] PENDL, H. 2015. Hematológia vtákov a plazov. Proc International Conference on Avian Herpetological and Exotic Mammal Medicine, 177-178.

[14] DIVERS, S.J. 2019. Diagnostic techniques and sample collection. In: Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery, vid. 3. St. Louis,

[15] PROECA, L.M. 2015. Odber krvi a intravenózny prístup u exotických druhov. In Proc International Conference on Avian Herpetological and Exotic Mammal Medicine, 122-126.

[16] PEREZ, J. 2012. Hematologické hodnotenie plazov: diagnostický základ, [online] [cit. 2023-03-13] doi: https://www.vetfolio.com/learn/article/hematologic-evaluation-of-reptiles-a-diagnostic-mainstay

[17] PERPINAN, D. 2017. Chelonian haematology 1. Collection and handling of samples. In Practice. 39(4), 2017, s 194-202

[18] SIGMA ALDRICH. 2020. Príbalový leták Hemacolor® [online] [cit. 2023-03-06] Dostupné na: file:///C:/Users/Master/Downloads/111956-cz-mk.pdf

[19] GIRI, D. 2019. Wright's Stain: Príprava, princíp, postup a výsledky [online] [cit.2023-03-19] doi: https://laboratorytests.org/wrights-stain/

[20] BIOGNOST. 2020. Wright-Giemsa: príbalový leták, [online] [cit. 2023-03-31] doi:https://www.biognost.com/wpcontent/uploads/2020/02/Wright-Giemsa-IFU-V4-EN4.pdf

[21] TEFFERI, A. 2004. Atlas klinickej hematológie. [online] [cit. 2023-03-23] doi :https://www.msdmanuals.com/professional/multimedia/image/wright-giemsa-stain-of-peripheral-blood-smear

[22] GRACIKOVA, K. 2019. Odber a analýza krvi Trachemys scripta. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, Bakalárska práca, 2019, s. 18-25

Sledovanie vplyvu $NiCl_2$ na fotosyntetické pigmenty, prolín a celkový proteóm *Euglena gracilis*

Monitoring the effect of $NiCl_2$ on photosynthetic pigments, proline and the total proteome of *Euglena gracilis*

Lucia Kotradyová[1] – Jana Moravčíková[2] – Maksym Danchenko[3] – Ľubica Uváčková[1]
Školiteľka: Ľubica Uváčková[1]
[1]Oddelenie biológie, Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava,
[2]Oddelenie biotechnológií, Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava,
[3]Chemický ústav, Slovenská Akadémia Vied, Dúbravska cesta 9, 845 38 Bratislava,
kotradyova1@ucm.sk, lubica.uvackova@ucm.sk

Abstrakt
Euglena gracilis je fototrofná mikroriasa, ktorá morfologickými zmenami, fotosyntézou, pigmentáciou a biochemickým zložením dokáže reagovať na environmentálny stres. Je schopná rásť vo variabilnom kultivačnom médiu čo značne uľahčuje kultiváciu. Počas experimentov sme sledovali vplyv troch koncentrácií $NiCl_2$ na kultúry (50 µM, 150 µM, 250 µM). Sledovali sme rozdiely v morfológii, raste buniek na cytologickej úrovni, koncentráciu fotosyntetických pigmentov a prolínu na biochemickej úrovni a zmeny celkového proteómu na proteomickej úrovni. Postupným zvyšovaním koncentrácie $NiCl_2$ v médiu došlo k zlyhávaniu antioxidačného systému, čoho dôsledok je znižovanie množstva prolínu v bunkách. Proteomickou analýzou sme dokázali prítomnosť proteínov zapojených do obranných mechanizmov, do energetického metabolizmu a do transkripcie proteínov.

Kľúčové slová: *Euglena gracilis*, ťažký kov, antioxidačný systém, stres, proteíny

Abstract
Euglena gracilis is phototrophic microalgae that can respond to environmental stress by changes in morphology, photosynthesis, pigmentation, and biochemical composition. *E. gracilis* is able to grow in a variable cultivation medium, which significantly facilitates cultivation. During the experiments, we monitored the effect of three concentrations of heavy metal $NiCl_2$ (50 µM, 150 µM, 250 µM). We monitored differences in morphology, cell growth at the cytological level, concentration of photosynthetic pigments and proline at biochemical level, and changes in the total proteome at the proteomic level. By increasing the concentration of $NiCl_2$ in the medium, the antioxidant system of cells failed, which is proved by a decrease in the amount of proline in the cells. We proved the presence of proteins involved in disease/defence mechanisms, energy metabolism and protein transcription by proteomic analysis.

Key Words: *Euglena gracilis*, heavy metal, antioxidant system, stress, proteins

Úvod

Euglena gracilis je fototrofný modelový organizmus, ktorý je zatriedený do kmeňa Euglenozoa. Tento kmeň zaraďujeme do superskupiny Excavata, čo predstavuje základnú eukaryotickú vetvu. Mikroriasa sa objavuje vo vodných biotopoch, kde morfológia bunky, motorické schopnosti, fotosyntéza či pigmentácia sú citlivými faktormi v reakcii na environmentálny stres (ťažké kovy, UV žiarenie, salinita, atď.). Na elimináciu toxicity ťažkých kovov využíva *E. gracilis* mechanizmy ako sekvestrácia kovov do chloroplastov a mitochondrií, zvýšenú syntézu molekúl chelatujúcich ťažké kovy, atď. Využitie eugleny spočíva v produkcii zlúčenín (α-tokoferol, paramylon, voskové estery, biotín, polynenasýtené mastné kyseliny), ktoré sa využívajú na výrobu nutraceutík, potravín či kozmeceutík [1, 2, 3].
Biomasu možno pestovať heterotrofne, fotoheterotrofne a fotoautrofne s použitím etanolu, glukózy, pyruvátu, laktátu ako zdroja uhlíka a energie. Je schopná rásť v širokom rozsahu pH, čo uľahčuje jej kultiváciu [1,4].
Euglena gracilis obsahuje očnú škvrnu, potravovú vakuolu a dva bičíky [2]. Disponuje možnosťou syntézy

širokého spektra zlúčenín v cytoplazme a chloroplastoch bunky, na čo majú vplyv predovšetkým rastové podmienky [1]. Predpokladom pre vznik trojmembránových plastidov je endosymbiotická udalosť, kedy fagotrofný hostiteľ pohltil eukaryotickú zelenú riasu [3]. Chloroplastový genóm má veľkosť 143 170 bp (obsahuje 149 intrónov a 96 génov). V závislosti od kultivačných podmienok a stresových faktorov boli dokázané globálne zmeny na transkripčnej úrovni. Organela disponuje vlastným genetickým aparátom, čo umožňuje syntézu proteínov, odzrkadľujúcich skutočný stav bunky [1].

Mitochondrie sú základnou organelou bunky *E. gracilis*, ktorej vnútorná membrána slúži na syntézu ATP. Mitochondrie sú schopné meniť svoj tvar v závislosti od podmienok rastu, spôsobu výživy, či prítomnosti rôznych inhibítorov. V bunkách prispôsobených na svetlo je sieť mitochondrií rozptýlená náhodne v cytoplazme s preferenciou lokalizácie v blízkosti plastidov, pravdepodobne v dôsledku lokálnej produkcie kyslíka. Hlavnými zložkami mitochondrií sú kobalamíny, chinóny, tokoferoly, cytochrómy, lipidy, aminokyseliny, atď. Vzhľadom na možnosť rastu *E. gracilis* v prítomnosti aj bez prítomnosti kyslíka, sú mitochondrie definované ako fakultatívne anaeróbne [2].

Euglena gracilis je schopná rásť a odstraňovať ťažké kovy z odpadových vôd, a to aj vo vysokých koncentráciách [2,5]. Khatiwada a kol. [6] dokázali akumuláciu 8,1 mg Cd na gram suchej hmoty, čo z mikroriasy robí hyperakumulátor pre tento kov. Identifikovali 4 493 proteínov, zapojených do reakcie bunky na ťažký kov, kde veľkú časť tvorili proteíny obsahujúce tiolovú skupinu a proteíny zapojené do reakcie na stres. Ťažké kovy obsadzujú sulfhydrylové skupiny proteínov, čím dochádza k narušeniu ich funkcií a zvýšenej produkcii reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Dôsledkom akumulácie ROS nastáva bunkový stres a v krajných prípadoch až apoptóza bunky. Ťažké kovy prenikajú do bunky buď endocytózou alebo aktívnym transportom, pričom sú schopné akumulovať aj viac ako jeden ťažký kov s rôznou toleranciou [6]. Mitochondriálne nosiče rozpustných látok transportujú kovové ióny do mitochondrií. Detoxikácia kovov v mitochondriách však nebola dokázaná, no existuje predpoklad pre spôsobenie toxicity a stresu v tejto organele [7]. Vplyvom určitej koncentrácie ťažkého kovu v prostredí dochádza k zvýšenej expresii génov kódujúcich (P5CS) enzým zapojený do biosyntézy prolínu, čím dochádza aj k zvýšenej koncentrácii prolínu v bunkách vplyvom stresu. Ako odpoveď bunky na nepriaznivé podmienky prostredia začne bunka akumulovať metabolity, medzi ktoré radíme aj prolín. Prolín chráni proteíny interakciou s molekulami vody na povrchu. V prítomnosti vysokej koncentrácie prolínu dochádza na základe experimentov aj k zvýšenej koncentrácii antioxidačných enzýmov (peroxidáza, superoxiddismutáza). Akumulácia kovov indukuje oxidačné poškodenie, čoho dôsledok je degradácia enzýmov, bielenie pigmentov, inaktivácia enzýmov, atď. Obranným mechanizmom voči nežiadúcim účinkom stresu je antioxidačná odpoveď. Pridávanie Cu iónov s koncentráciou 10 µM v kultivačnom médiu zelenej riasy *Scenedesmus* sp. zvýšilo biosyntézu prolínu, zatiaľ čo koncentrácia Cu iónov nad 10 µM v médiu mala inhibičný účinok na biosyntézu [4]. Sledovanie zmeny v zložení proteínov v rámci celkového proteómu *E. gracilis* izoláciou a identifikáciou proteínov proteomickými nástrojmi, hlavne hmotnostnou spektrometriou (MS), nám dáva nové informácie a tieto poznatky sú veľmi cenné.

1. Experimentálny materiál a metódy

Ako experimentálny materiál sme použili *Euglena gracilis* kmeň Z, ktoré sme získali zo SAG 1224-5/25 Collection of Algae, Göttingen, Nemecko.

1.1 Kultivácia buniek *Euglena gracilis* v Cramer-Myersovom médiu

Bunky *E. gracilis* sme kultivovali v Cramer-Myersovom médiu [8] v Erlenmeyerových bankách. K 50 ml CM média sme pridali 300 µl 96% etanolu, 250 µl vitamínu B_1, 10 µl vitamínu B_{12} a 300 µl kultúry *Euglena gracilis* kmeň Z. Pripravili sme tri rôzne koncentrácie $NiCl_2$ (50 µM, 150 µM, 250 µM). Ako kontrolu sme používali kultúru bez pridania $NiCl_2$ do kultivačného média. Všetky varianty sme kultivovali staticky pri teplote 23°C, 14 dní za stáleho osvetlenia.

1.2 Počítanie buniek

Rastovú krivku sme pripravili počítaním buniek počas ich každodenného pozorovania pod mikroskopom OLYMPUS CX23 (pri 100-násobnom zväčšení) v Bürkerovej komôrke. Pre zabezpečenie objektívnych výsledkov sme kultúry, kde sme neboli schopní jednoznačne určiť počet buniek, riedili destilovanou vodou a bunky sme znehybnili formaldehydom. Oba faktory sme zohľadnili v použitom vzorci (1). Experiment sme vykonávali v triplikátoch, kde sme do vzorca (1) použili aritmetický priemer počtu buniek. Zo získaných hodnôt sme zhotovili Graf 1.

$$b = \frac{n}{c.v.h} . x.r.f \quad (1)$$

b - počet buniek v 1 mm^3
n - celkový počet spočítaných buniek
c - počet štvorcov, v ktorých sme počítali
v - plocha počítaného štvorca
h - hĺbka komôrky
x - prepočet na 1 ml
f - riedenie formaldehydom
r - použité riedenie

1.3 Stanovenie koncentrácie chlorofylu *a*, *b* a karotenoidov v kultúrach

K zmrazenej šesťdňovej kultúre *E. gracilis* sme pridali CM médium v pomere 1:2. Do zhomogenizovaného materiálu sme pridali 80% acetón v pomere 1:2,5. Absorbanciu sme zmerali pri troch vlnových dĺžkach 662, 645 a 470 nm. Koncentrácie pigmentov sme vypočítali dosadením hodnôt do vzorcov (2,3,4,5) [9].

$$\text{Chl } a = \frac{[11{,}75 . (A\,662) - 2{,}35 . (A\,645)]}{1000} \quad (2), [9]$$

$$\text{Chl } b = \frac{[18{,}61 . (A\,645) - 3{,}96 . (A\,662)]}{1000} \quad (3), [9]$$

$$\text{Total Chl} = \text{Chl } a + \text{Chl } b \quad (4), [9]$$

$$\text{Car} = \frac{[1000 . (A\,470) - 227 . \text{Chl } a - (\frac{81{,}4 . \text{Chl } b}{227})]}{1000} \quad (5), [9]$$

Chl *a* - chlorofyl *a*
Chl *b* - chlorofyl *b*
Total Chl - celkový chlorofyl
Car - karotenoidy
A 662 - absorbancia nameraná pri vlnovej dĺžke 662 nm
A 645 - absorbancia nameraná pri vlnovej dĺžke 645 nm
A 470 - absorbancia nameraná pri vlnovej dĺžke 470 nm

1.4 Stanovenie koncentrácie prolínu v bunkách

Pre určenie koncentrácie prolínu vo všetkých typoch kultúr sme si pripravili kalibračnú krivku. Zmrazené šesťdňové kultúry sme zhomogenizovali v 500 µl 96% etanole. K suspenzii sme pridali 1000 µl 96% etanolu. V trecej miske sme narušili bunkové štruktúry. Takto pripravenú suspenziu sme centrifugovali 10 minút pri 24°C a 4 000 otáčkach. K supernatantu sme pridali reakčnú zmes (1 % (w/v) ninhydrín, 20 % (v/v) etanol a 60 % (v/v) kyselina octová) v pomere 1:1. Zmes sme inkubovali pri 96°C 20 minút. Absorbanciu sme merali pri vlnovej dĺžke 520 nm. Výslednú koncentráciu prolínu v bunkách *E. gracilis* sme vypočítali na základe rovnice regresie, z grafu kalibračnej krivky (6) [10].

$$y = 0{,}7172x - 0{,}068 \quad (6)$$

1.5 Extrakcia proteínov

Materiál sme zhomogenizovali v trecej miske s pridaným tekutým dusíkom. Proteíny sme extrahovali z buniek zásobným extrakčným roztokom (0,9 M sacharózy, 10mM EDTA, 100mM Tris-HCl) s pH 8,8. K zmesi sme pridali 20 µl merkaptoetanolu a 5 ml fenolu. Extrakcia prebiehala 30 minút na rotačnej trepačke pri 4°C. Po centrifugácii pri 4°C, 4000 otáčkach 10 minút sme odobrali fenolovú fázu a pridali 0,1 M octan amónny v pomere 1:5. Proteíny sme zrážali cez noc pri -20°C. Proteíny sme premyli 2-krát 0,1 M octanom amónnym, 2-krát vymrazeným 80%-ným acetónom. Materiál sme uchovávali v mrazničke. Extrakciu proteínov sme vykonali podľa Hajduch a kol. [11].

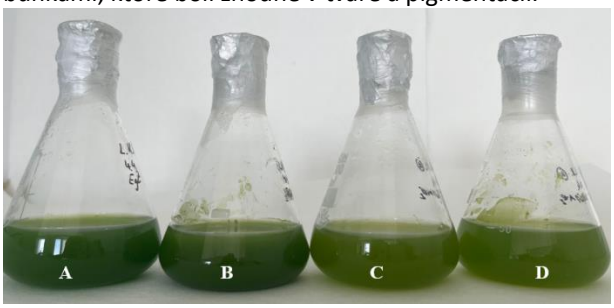
1.6 Štiepenie proteínov a MS analýza

Štiepenie proteínov trypsínom v roztoku sme vykonali podľa Hughes a kol. [12]. Následná kvapalinová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou a bioinformatickým spracovaním výsledkov bola vykonaná podľa Škodová-Sveráková a kol. [13].

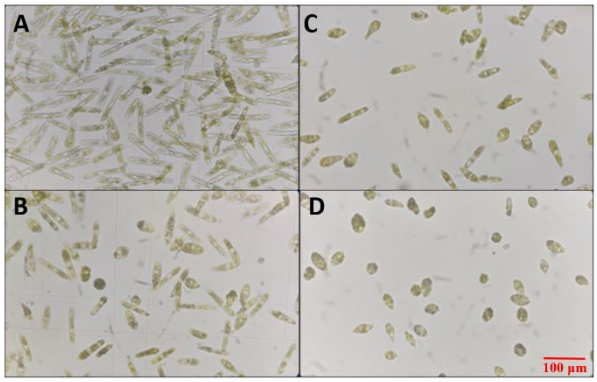
2 Výsledky a diskusia

Počas kultivácie kontrolných buniek *E. gracilis* a kultúry buniek ovplyvnenej rôznou koncentráciou $NiCl_2$ v kultivačnom médiu sme bunky pozorovali pod mikroskopom, a zaznamenali sme nielen zmeny vo sfarbení kultúry (Obr. 1), ale aj zmenu v morfológii

buniek (Obr. 2) a zmenu v pohybe buniek. Podľa fotografií Nam a kol. [14] potvrdzujeme morfologickú podobnosť kontrolných buniek *E. gracilis* s našimi bunkami, ktoré boli zhodné v tvare a pigmentácii.



Obr. 1 Kontrolná kultúra *Euglena gracilis* (**A**); kultúra kultivovaná s koncentráciou $NiCl_2$ v kultivačnom médiu 50 µM (**B**); kultúra kultivovaná s koncentráciou $NiCl_2$ v kultivačnom médiu 150 µM (**C**); kultúra kultivovaná s koncentráciou $NiCl_2$ v kultivačnom médiu 250 µM (**D**) v 8. deň kultivácie.

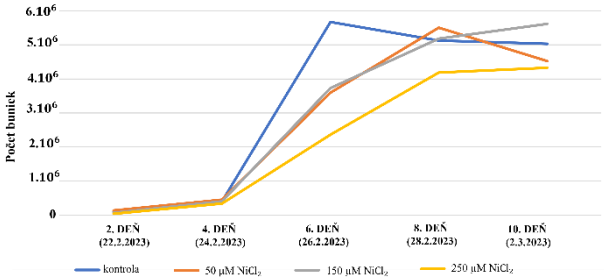


Obr. 2 Kontrolná kultúra *Euglena gracilis* (**A**); kultúra buniek *E. gracilis* s koncentráciou $NiCl_2$ v médiu 50 µM (**B**); kultúra buniek *E. gracilis* s koncentráciou $NiCl_2$ v médiu 150 µM (**C**); kultúra buniek *E. gracilis* s koncentráciou $NiCl_2$ v médiu 250 µM (**D**). Kultúry boli pozorované pri zväčšení 10 X 10 v 8. deň kultivácie.

Najvýraznejší rozdiel sme zaznamenali medzi kontrolou a vzorkou s koncentráciou $NiCl_2$ v médiu 250 µM. Bunky v kontrole vykazovali rýchly pohyb a prevažovali bunky s predĺženou morfológiou. So stúpajúcou koncentráciou ťažkého kovu v prostredí sa tvar bunky postupne menil na oválny, až v kultúrach s koncentráciou $NiCl_2$ 250 µM v médiu boli v prevahe guľaté bunky, ktoré vykazovali výrazne nižšiu rýchlosť pohybu. Bunky kultivované v médiu s koncentráciou $NiCl_2$ 50 µM začali meniť morfológiu v piaty deň kultivácie, zatiaľ čo rýchlosť pohybu sa líšil už v druhý deň kultivácie v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Rapídnejšie zmeny sme pozorovali v kultúrach s koncentráciou $NiCl_2$ 150 µM, kde bol pohyb znova pomalší v porovnaní s kultúrou s koncentráciou 50 µM $NiCl_2$ v kultivačnom médiu. V kultúre s koncentráciou $NiCl_2$ 150 µM sme pozorovali väčší počet buniek s guľatou morfológiou. Takmer všetky bunky v kultúre s koncentráciou $NiCl_2$ 250 µM mali oválny tvar buniek a ich pohyb bol v porovnaní s kontrolnou vzorkou minimálny.

Zvyšujúca sa koncentrácia ťažkého kovu v prostredí sa prejavila aj na počte buniek v kultúrach (Graf 1). Zheng a kol. [15] pozorovali mierne zvýšenie počtu buniek počas kultivácie *C. reinhardtii* s koncentráciou Ni 60 µM v kultivačnom médiu. Pri koncentrácii 120 – 150 µM sa rast výrazne znížil.

Graf 1 Rastová krivka kontrolnej bunkovej kultúry

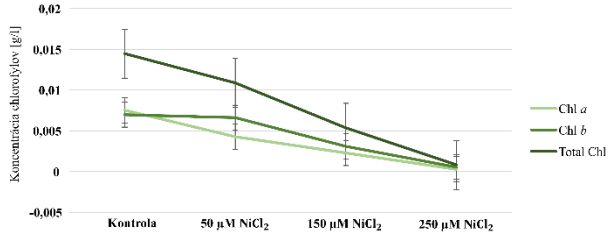


Euglena gracilis v porovnaní s rastom buniek v stresových podmienkach (50 µM $NiCl_2$, 150 µM $NiCl_2$, 250 µM $NiCl_2$).

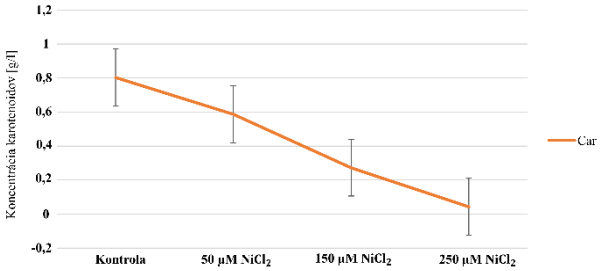
Najvyšší počet buniek sme zaznamenali v kontrolnej vzorke v 6. deň kultivácie ($5{,}6.10^6$ buniek/ml), čo zodpovedá experimentom podľa Nam a kol. [14]. V kultúrach s koncentráciou $NiCl_2$ 50 µM v kultivačnom médiu sme výrazný rozdiel v počte buniek nezaznamenali, no log fázu dosiahla kultúra o 2 dni neskôr. V prípade kultúr s koncentráciou $NiCl_2$ 150 µM v médiu sme maximálny počet buniek nenamerali, no na základe priebehu rastovej krivky môžeme pozorovať posun log fázy v porovnaní s kontrolou. Najvýraznejší rozdiel sme zaznamenali v kultúrach s koncentráciou $NiCl_2$ 250 µM v kultivačnom médiu. Maximálny nameraný počet buniek bol $4{,}3.10^6$ buniek/ml, čo zodpovedalo 10. dňu kultivácie. Ünal a kol. [16] dokázali bunkovú smrť u zelenej riasy *U. lactuca* vplyvom Cr(VI) s koncentráciou 1 mM a 5 mM v kultivačnom médiu. Klesajúci trend v počte buniek vplyvom ťažkého kovu potvrdzuje aj náš experiment.

Vplyv $NiCl_2$ sme dokázali aj klesajúcou koncentráciou chlorofylu *a*, chlorofylu *b,* celkového chlorofylu (Graf 2) a karotenoidov (Graf 3). Vzhľadom na zvyšujúcu sa

koncentráciu ťažkého kovu v kultúrach došlo k poklesu pigmentov v bunkách, tzn. poklesu fotosyntézy.



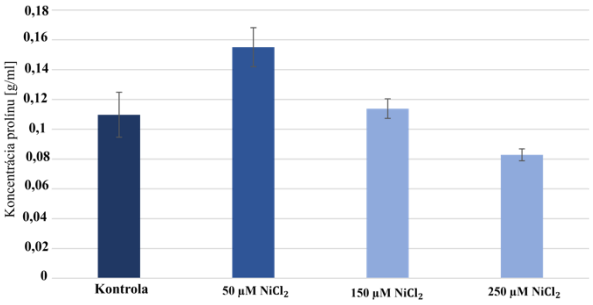
Graf 2 Krivka koncentrácie chlorofylu *a*, *b* a celkového chlorofylu v kontrolnej kultúre *E. gracilis* a v kultúrach ovplyvnených ťažkým kovom.



Graf 3 Krivka koncentrácie karotenoidu v kontrolnej kultúre *E. gracilis* a v kultúrach s rôznou koncentráciou $NiCl_2$ v kultivačnom médiu.

Maximálne hodnoty chlorofylov a karotenoidov boli zaznamenané v kontrolnej vzorke. Koncentrácie pigmentov postupne klesali, až po najnižšie namerané hodnoty v kultúrach s koncentráciou $NiCl_2$ 250 µM v kultivačnom médiu. Klesajúci trend chlorofylov so stúpajúcou koncentráciou niklu v médiu potvrdzuje aj Idrees a kol. [17].

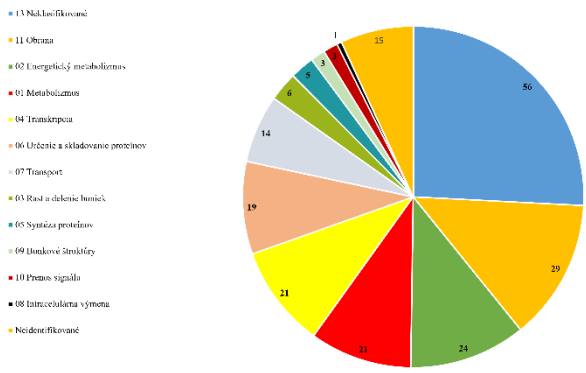
Na základe výsledok experimentu zameraného na meranie koncentrácie prolínu v bunkách usudzujeme, že ťažký kov spúšťa antioxidačnú reakciu v mikroorganizme (Graf 4). Nam a kol. [14] poukazuje na inhibíciu rastu a fotosyntetickej aktivity *Euglena gracilis* ovplyvnenej niklom. Zmeny koncentrácie chlorofylov a karotenoidov vplyvom $CuSO_4.5H_2O$ sledoval aj Kondzior a Butarewic [18]. Experimentami dokázali pokles fotosyntetických pigmentov u *C. vulgaris* vplyvom ťažkého kovu. Štúdia dokazuje až 63% pokles chlorofylu *a* a 58% pokles chlorofylu *b* vplyvom koncentrácie $CuSO_4.5H_2$ 0,15 mg/dm^3 v kultivačnom médiu v porovnaní s kontrolou po 7 dňoch kultivácie. Zinok v tomto prípade vykazoval ešte rapídnejšie účinky. Koncentrácia $ZnSO_4.7H_2O$ 100 mg/dm^3 v kultivačnom médiu znížil chlorofyl *b* aj *a* po 7 dňoch kultivácie o 100% a karotenoidy taktiež o 100%.



Graf 4 Graf znázorňujúci koncentráciu prolínu v kontrolnej kultúre *E. gracilis* a v kultúrach s rôznou koncentráciou $NiCl_2$ v kultivačnom médiu.

Bunky s koncentráciou 50 µM $NiCl_2$ v kultivačnom médiu vykazovali najvyššiu úroveň prolínu, čo zodpovedá najvyššej aktivite antioxidačného systému. Postupným nárastom koncentrácie ťažkého kovu v médiu došlo k poklesu koncentrácie prolínu v bunkách, čo môže byť dôsledkom postupného zlyhávania antioxidačného systému. Koncentrácia $NiCl_2$ 250 µM v kultivačnom médiu je na základe koncentrácie prolínu presahujúca možnosti antioxidačného systému zvládať vplyv stresu. Zheng a kol. [15] analyzovali vplyv niklu na *Chlamydomonas reinhardtii*, kde dokázali zvýšenú akumuláciu prolínu vplyvom ťažkého kovu.

Po extrakcii proteínov sme vykonali MS analýzu, ktorou sme identifikovali 217 proteínov, ktoré sme zatriedili do 12 funkčných skupín podľa Bevana a kol. [19] (Graf 5). 56 proteínov bolo nezaradených, 29 proteínov sme zaradili do skupiny obrana, 24 do skupiny energetický metabolizmus, 21 do skupiny metabolizmus, rovnako 21 do skupiny transkripcia, 19 proteínov sme zaradili do skupiny určenie a skladovanie proteínov, 14 do skupiny transport, 6 do skupiny proteínov zodpovedných za rast a delenie buniek, 5 proteínov sme zatriedili do skupiny syntéza proteínov, 3 do skupiny bunkové štruktúry, rovnako 3 do skupiny prenos signálu a 1 proteín do skupiny intracelulárna výmena.



Graf 5 Graf znázorňujúci rozdelenie identifikovaných proteínov do 12 funkčných skupín podľa Bevana a kol. [19].

Záver

Prácou sme sledovali vplyv $NiCl_2$ na bunku *Euglena gracilis*. Voľným okom pozorovateľné zmeny sú v pigmentácii buniek, morfológii a motorických schopnostiach stresovaných buniek oproti kontrole. Vplyv $NiCl_2$ sme sledovali zmenou v počte buniek, kde v prípade kultúr s koncentráciou $NiCl_2$ 50 µM a 150 µM v kultivačnom médiu došlo k posunu log fázy. Kultúry s koncentráciou $NiCl_2$ 250 µM v médiu disponovali zníženým počtom buniek v porovnaní s kontrolou. Rozdiely v pigmentácii sme ďalej sledovali kvantitatívnym stanovením chlorofylu *a*, *b* a karotenoidov. Stanovením koncentrácie prolínu v bunkách sme sledovali aktivitu antioxidačného systému kontrolných a stresovaných buniek. V kultúrach s koncentráciou $NiCl_2$ 50 µM v kultivačnom médiu došlo k zvýšenej koncentrácii prolínu v porovnaní s kontrolou, zatiaľ čo v bunkách s koncentráciou $NiCl_2$ 150 µM a 250 µM v médiu došlo k zníženiu jeho koncentrácie. Táto skutočnosť pravdepodobne poukazuje na neschopnosť buniek vyrovnať sa s vysokou koncentráciou ťažkého kovu v prostredí. Proteomické zmeny monitorujeme zatriedením proteínov podľa Bevana a kol. [19] do 12 funkčných skupín, kde 29 proteínov sme zaradili do skupiny obrana, 24 proteínov sme zaradili do funkčnej skupiny energetický metabolizmus, 21 proteínov sme zaradili do skupiny metabolizmus a 20 proteínov do skupiny transkripcia.

Poďakovanie

Veľké poďakovanie patrí doc. RNDr. Ľubici Uváčkovej, PhD. za cenné rady počas experimentálnej práce a usmerňovania v písaní odborného článku. Rovnako ďakujem doc. Ing. Jane Moravčíkovej, PhD., ktorá ma taktiež sprevádzala experimentálnou časťou práce a pomáhala mi svojimi cenným skúsenosťami z praxe. Ďakujem Dr. Maksymovi Danchenkovi za MS analýzy. Práca bola podporená projektom VEGA - 1/0694/21.

Použitá literatúra

[1] KRAJČOVIČ, Juraj a kol. 2015. Euglenoid flagellates: A multifaceted biotechnology platform. In Journal of Biotechnology, roč. 202, s. 135-145. ISSN 0168-1656.
[2] ZIMORSKI, Verena. a kol. 2017. Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology. Cham, 304 s. ISBN 978-3-319-54910-1.
[3] CHEN, Zhenfan a kol. 2022. Proteomic Responses of Dark-Adapted Euglena gracilis and Bleached Mutant Against Light Stimuli. In Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, roč. 10, ISSN 22964185.
[4] BARERA, Simone – FORLANI, Giuseppe. 2023. The role of proline in the adaptation of eukaryotic microalgae to environmental stress: An underestimated tool for the optimization of algal growth. In Journal of Applied Phycology, roč. 35, č. 4, s. 1635-1648. ISSN 15735176.
[5] AHMED, Hoda – HÄDER, Donat Peter. 2010. Rapid ecotoxicological bioassay of nickel and cadmium using motility and photosynthetic parameters of Euglena gracilis. In Environmental and Experimental Botany, roč. 69, č. 1, s. 68-75. ISSN 0098-8472.
[6] KHATIWADA, Bishal a kol. 2020. Proteomic response of Euglena gracilis to heavy metal exposure – Identification of key proteins involved in heavy metal tolerance and accumulation. In Algal Research, roč. 45. ISSN 2211-9264.
[7] KHATIWADA, Bishal a kol. 2020. Probing the Role of the Chloroplasts in Heavy Metal Tolerance and Accumulation in Euglena gracilis. In Microorganisms, roč. 8, č. 1. ISSN 2076-2607.
[8] CRAMER, Marian – MYERS, Jack. 1952. Growth and photosynthetic characteristics of euglena gracilis. In Archiv für Mikrobiologie, roč. 17, č. 1-4, s. 384-402. ISSN 03028933.
[9] TIMOTIUS, Vincent a kol. 2022. The content of lipid, chlorophyll, and carotenoid of Euglena sp. under various salinities. In AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol, roč. 30, č. 3, s. 114-122. ISSN 0128-7451.
[10] PEQUIN, Roger – LECHASSEUR, Pierre. 2011. Observations sur une méthode de dosage de la proline libre dans les extraits de plantes. In Canadian Journal of Botany, roč. 57, č. 18, s. 1851-1854. ISSN 0008-4026.
[11] HAJDUCH, Martina kol. 2005. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution twodimensional

reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. In Plant physiology, roč. 137, č. 4, s. 1397-1419. ISSN 1532-2548.
[12] HUGHES, C. S. a kol. 2019. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. In Nature, roč. 14, č. 1, s. 68-85. ISSN 1750-2799.
[13] ŠKODOVÁ-SVERÁKOVÁ, Ingrid a kol. 2021. Highly flexible metabolism of the marine euglenozoan protist Diplonema papillatum. In BMC biology, roč. 19, č. 1, s. 1-21. ISSN 17417007.
[14] NAM, Sun Hwa a kol. 2023. The potential of Euglena species as a bioindicator for soil ecotoxicity assessment. In Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, roč. 267. ISSN 1532-0456.
[15] ZHENG, Qi a kol. 2013. *HISN3* Mediates Adaptive Response of *Chlamydomonas reinhardtii* to Excess Nickel. In Plant and Cell Physiology, roč. 54, č. 12, s. 1951-1962. ISSN 1471-9053.
[16] ÜNAL, Dilek a kol. 2010. Effects of Chromium VI stress on green alga *Ulva lactuca* (L.) Effects of Chromium VI stress on green alga Ulva lactuca (L.). In Turkish Journal of Biology, roč. 34, č. 2, s. 119-124 . ISSN 1300-0152.
[17] IDREES, Mohd a kol. 2013. Salicylic acid restrains nickel toxicity, improves antioxidant defence system and enhances the production of anticancer alkaloids in Catharanthus roseus (L.). In Journal of Hazardous Materials, roč. 252, s. 367-374. ISSN 0304-3894.
[18] KONDZIOR, Paweł – BUTAREWICZ, Andrzej. 2018. Effect of Heavy Metals (Cu and Zn) on the Content of Photosynthetic Pigments in the Cells of Algae *Chlorella vulgaris*. In Journal of Ecological Engineering, roč. 19, č. 3, s. 18-28. ISSN 2299-8993.
[19] BEVAN, M a kol. 1998. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. In Nature, roč. 391, s. 485-488. ISSN 1476-4687.

Porovnanie reprodukčných parametrov tetraploidného a pentaploidného cytotypu *Solidago gigantea* v nepôvodnom areáli

Comparison of reproduction parameters of tetraploid and pentaploid cytotype of *Solidago gigantea* in a non-native area

Michaela Murgašová[1] – Katarína Skokanová[2]– Barbora Šingliarová[3]
[1]Katedra biológie a ekológie, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica,
[2,3]Botanický ústav CBRB SAV, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava
[1] mmurgasova@student.umb.sk, [2]katarina.skokanova@savba.sk, [3]barbora.singliarova@savba.sk

Abstrakt

Problematika inváznych rastlín je, vzhľadom na negatívny dopad na biodiverzitu, hospodárstvo i ľudské zdravie, jednou z najaktuálnejších výskumných tém. Jedným z dôvodov, prečo sú nepôvodné druhy úspešné, je polyploidizácia a následné genetické a fenotypové zmeny.

Severoamerický taxón *Solidago gigantea* sa v pôvodnom areáli vyskytuje v troch cytotypoch: diploidnom, tetraploidnom a hexaploidnom.

Z Európy bol doteraz uvádzaný len výskyt tetraploidov. Len nedávno bola prvýkrát zdokumentovaná existencia aj pentaploidných populácií v nepôvodnom areáli.

V práci sme zisťovali a porovnávali reprodukčný potenciál oboch cytotypov prostredníctvom troch parametrov: úroveň samčej a samičej plodnosti, klíčivosť semien a karyologická variabilita potomstva.

Výsledky preukázali, že pentaploidy majú znížený potenciál generatívneho šírenia. Produkcia peľu, semien a ich klíčivosť je však pomerne vysoká.

Navyše variabilné gaméty vstupujúce do rozmnožovania môžu viesť k vzniku nových cytotypov s neznámym inváznym potenciálom.

Náš výskum podčiarkuje význam štúdia procesov prebiehajúcich v populáciách po invázii nového areálu.

Kľúčové slová: inv̈azne rastliny, klíčivosť, peľová analýza, polyploidizácia, produkcia semien

Abstract

Plant invasions are one of the most actual research topics due to negative impact on biodiversity, economy and human health. One of the reasons for the success of non-native species is polyploidisation and subsequent genetic and phenotypic changes.

The North-American *Solidago gigantea* has three cytotypes in its native range: diploid, tetraploid and hexaploid cytotype. In Europe, only tetraploids have been recorded so far. But recently, pentaploid populations have been discovered there also.

In this work, we investigated and compared the reproductive potential of the two cytotypes through three parameters: male and female fertility, seed germination rate and karyological variability of offspring.

The results showed reduced generative potential of pentaploids. However, pollen, seed production and germination rate are still relatively high.

Moreover, variable gametes entering reproduction can lead to formation of new cytotypes with unknown invasion potential.

Our research underscores the importance of studying the processes occurring in populations after invasion of a new range.

Key Words: invasive plants, germination, pollen analysis, polyploidization, seed production

Úvod

Polyploidizácia sa považuje za jednu z najdôležitejších hnacích síl evolúcie krytosemenných rastlín [1]. Predstavuje výskyt troch a viacerých chromozómových sád v jadre somatickej bunky [2]. Polyploidia sa môže vyskytovať v dvoch formách ako alloploidia alebo autopolyploidia. Polyploidizácia zvyšuje génovú variabilitu, a poskytuje tak genetické a adaptačné výhody, čo vedie k vyššej kondícii a úspešnému prežívaniu. Dôsledkom polyploidizácie môžu byť tiež zmeny v reprodukčnej stratégii a v ďalších vlastnostiach spojených s fitnesom (životaschopnosťou) rastlín [3,4].

Problematika inváznych rastlinných druhov je čoraz viac aktuálna, pretože inv̈ázie prebiehajú nepretržite a druhy ešte nemuseli úplne obsadiť všetky vhodné stanovištia [5].

Aj v prípade inváznych rastlín polyploidizácia často zvyšuje úspešnosť kolonizácie a následného šírenia sa [6,7].

V súčasnosti sú dva nepôvodné druhy severoamerického pôvodu, a to zlatobyľ kanadská - *S. canadensi*s L. (*Asteraceae*) a zlatobyľ obrovská - *S. gigantea* Ait. (*Asteraceae*) považované za jedny z najagresívnejších inváznych druhov v Európe [8,9]. *Solidago canadensis* zahŕňa iba diploidy (2n=2x=18) v pôvodnom aj v introdukovanom areáli [10].

Naopak *S. gigantea* je polyploidný komplex, ktorý má v pôvodnom severoamerickom areáli tri cytotypy: diploidný 2n=18, tetraploidný 2n=36 a hexaploidný cytotyp 2n=54 [11].

Po dlhú dobu bolo známe, že inv̈ázny je len tetraploidný cytotyp [12], no nedávno bol na Východnom Slovensku v povodí rieky Ondava objavený pomerne hojne rozšírený pentaploidný cytotyp [13]. Pre *S. gigantea* bolo už v minulosti zistené, že existuje vzťah medzi inváznosťou a stupňom ploidie [1,2,14], no doteraz nebol nikdy skúmaný inv̈ázny potenciál novoobjaveného pentaploidného cytotypu.

Nie je ani známe, či v dôsledku nepárneho počtu chromozómových sád a problematickej meiózy u 5x *S. gigantea* dochádza k narušeniu gametogenézy, ktorá sa môže prejaviť zníženou plodnosťou (nevitálny peľ a semená).

Cieľom štúdie preto bolo zistiť a porovnať reprodukčné parametre tetraploidného (4x) a pentaploidného (5x) cytotypu *S. gigantea*, za účelom odhadu inv̈azného potenciálu novoobjaveného cytotypu.

Skúmanými parametrami boli životaschopnosť peľových zrniek, podiel a veľkosť dobre vyvinutých semien (seed set) a napokon ich klíčivosť a karyologická variabilita potomstva.

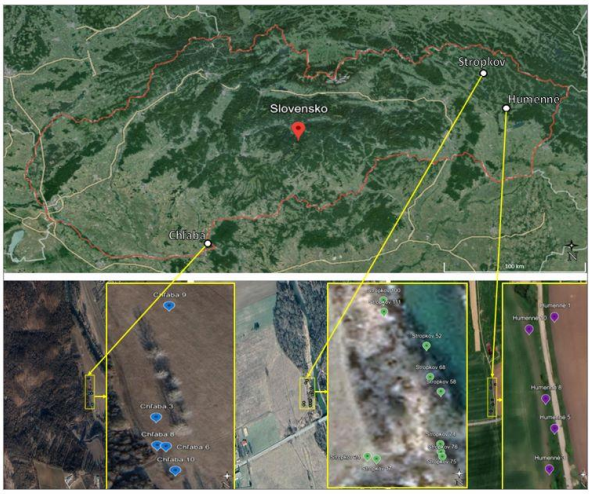
1 Materiál a metodika

1.1 Zber rastlinného materiálu

Počas terénnych výjazdov sa zozbieral materiál z 20 jedincov *S. gigantea*. Rastlinný materiál z pentaploidného cytotypu *S. gigantea* bol zbieraný v Stropkove [13]. Na ďalších dvoch lokalitách v Humennom a v obci Chľaba (okres Nové Zámky) boli zozbierané dve čisté tetraploidné populácie tohto druhu (Obr.1). Každá z lokalít bola navštívená dvakrát, v auguste a októbri 2023. Prvýkrát boli rastliny (t.j. konkrétna kvitnúca byľ) zamerané a označené pomocou GNSS prístroja s presnosťou na 1-2 cm.

Počas prvej návštevy sa z každej rastliny odobrala časť kvitnúcej byle pred otvorením peľových tyčiniek (na peľové analýzy) a čerstvý listový materiál (na prietokovú cytometriu).

Počas druhej návštevy sme odobrali časť odkvitnutej byle s dozretými semenami (na stanovenie produkcie a veľkosti semien, klíčivosti a karyologickej varibility potomstva).



Obr.1 Poloha jednotlivých zozbieraných jedincov *Solidago gigantea* z dvoch tetraploidných populácií (Chľaba - modré body, Humenné – fialové body) a jednej pentaploidnej populácie (Stropkov – zelené body). [Mapové podklady: Google Earth, 2024]

Čerstvý rastlinný materiál bol ihneď po zbere zanalyzovaný prietokovou cytometriou. Súkvetia boli pred kvitnutím, ako aj po dozretí semien sušené pri izbovej teplote v papierových vrecúškach.

Plastové vrecúška so semenami v silikagéli sa uložili po 1 mesiaci do chladničky, kým neboli použité na analýzy alebo na vysiatie.

1.2 FCM analýzy materských rastlín a semenáčikov

Zo skúmaného druhu sme 20tim materským rastlinám zmerali hodnoty relatívneho obsahu DNA prostredníctvom DAPI prietokovej cytometrie. Tieto hodnoty sa následne porovnávali s hodnotami relatívnej veľkosti genómu a ploidnou úrovňou analyzovaných klíčencov.

Príprava vzoriek pre cytometrické analýzy prebiehala prostredníctvom dvojkrokového protokolu. [15].

Do čistej Petriho misky sa napipetovalo 500 µl ľadového pufra OTTO I (0.1 M kyseliny citrónovej, 0,5 % Tween 20), kde sa následne umiestnilo 0,5 cm^2 lístku materskej rastliny alebo semenáčik spolu s 0,5 cm^2 lístku druhu ľuľok paprikovitý (*Solanum pseudocapsicum* L.) Tento druh slúžil ako referenčný štandard pretože poznáme veľkosť jeho genómu (2.59 pg DNA/2C) [16].

Semenáčik aj referenčný štandard boli spolu v pufri nasekané žiletkou na drobné kúsky, za účelom uvoľnenia jadier. Táto suspenzia bola potom prefiltrovaná cez nylonovú sieťovinu (42-µm) do vopred označenej skúmavky. Vzorky boli zafarbené farbivom DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) pridaním 600 µl pufra OTTO II. Filtráty boli následne podrobené analýzou prietokovým cytometrom.

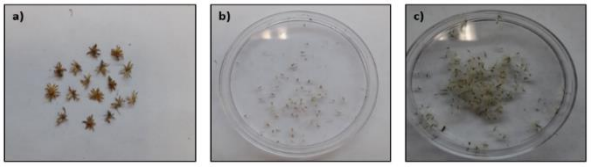
Relatívny obsah DNA sme interpretovali ako pomer pozície G1 píku referenčného štandardu a analyzovaného semenáčika (RSS). Ploidia bola interpretovaná porovnaním s hodnotami zaznamenaných pre rastliny so známou veľkosťou genómu a chromozómovým počtom [17].

1.3 Produkcia semien

Vzhľadom na obrovský počet semien produkovaných v jednom súkvetí zlatobyle obrovskej (až 100 tisíc), podiel dobre vyvinutých semien (seed set) sme zisťovali len vo vybranej časti súkvetia (10-20 úborov).

Z vybranej časti súkvetia sme zaznamenali počet úborov. Z každého úboru sme opatrne vybrali dozreté aj nevyvinuté semienka, pričom sme obidve skupiny vytriedili na osobitné Petriho misky a spočítali (Obr.2a,b,c).

Veľkosť semien sa určovala nasnímaním fotiek pomocou mikroskopu Axio Scope.A1, ktorý bol napojený na program QuickPHOTO MICRO, kde sa pri každom semene zmerala v najširšom mieste dĺžka a šírka.



Obr.2 Triedenie semien za účelom vytvorenia seed setu. Počet úborov v analyzovanej časti súkvetia (2a) a podiel dobre vyvinutých (2b) a nevyvinutých semien (2c) z jednej skúmanej materskej rastliny.

1.4 Klíčivosť semien

Semenný materiál bol dopredu nachystaný na výsadbu. Z nazbieraných dozretých súkvetí bolo za každú materskú rastlinu vytriedených do 3 malých papierových vrecúšok presne po 50 semien (dokopy 150 za materskú rastlinu). V niektorých prípadoch sme na materskú rastlinu nemali k dispozícii 150 ks, použil sa teda maximálny možný získaný počet dozretých semien.

Vopred sa pripravilo 60 plastových misiek, do ktorých sme vyvŕtali 8 dier rovnomerne po ploche dna misky, aby mohla odtiecť nadbytočná voda. Ako absorpčný materiál poslúžil obdĺžnik filcu, ktorý sme umiestnili do misky.

Potom sme na filc položili obdĺžnik poskladanej papierovej utierky. Kvetináče sme označili štítkami s údajom o populácií a čísle rastliny.

Takmer každú z 20 rastlín sme vysievali v troch opakovaniach (A, B, C), pričom v skoro každom opakovaní sa vysial stanovený počet 50 plne dozretých semien. Výnimky v tomto predstavovali semená z troch rastlín (Stropkov 17 –> 13 semien; Stropkov 100 –> 4 semená a Stropkov 111 –> 0 semien). Semená sme jemne zvlhčili destilovanou vodou a misky prikryli viečkom. Misky sa umiestnili na pestovateľské platá, tiež vystlané filcom. Na polievanie sa používala destilovaná voda.

Vysievanie semien prebiehalo v druhej polovici januára (18.1.2024), následne sa v pravidelnom 2-dňovom intervale (23.1 – 22.3.2024) počítali vyklíčené semienka.

1.5 Analýzy peľu

Pozorovanie životaschopnosti peľových zrniek, zafarbených Alexandrovým farbivom, pomocou svetelného mikroskopu nám umožnilo odhadnúť úroveň samčej plodnosti, a tým aj potenciál generatívnych a ďalších interakcií so spoločne sa vyskytujúcimi cytotypmi *S. gigantea*.

Veľkosť peľových zrniek sa často používa ako parameter na odhadnutie ploidie a vitality peľových zrniek [19].

Z každej rastliny sme vybrali päť úborov s neotvorenými peľnicami a z každého úboru sme odobrali po jednej peľnici.

Peľnice boli na podložnom sklíčku v kvapke etanolu pod stereo lupou jemne rozsekané a roztlačené skalpelom, aby sa uvoľnili peľové zrnká. V preparáte sa odstránili hrubé nečistoty, potom sa preparát zafarbil 2-3 kvapkami Alexandrovho farbiva [18]. Zafarbené preparáty sa sušili pri teplote 65 °C po dobu 10 minút.

Po vysušení sa priložilo krycie sklíčko a celý preparát bol po obvode zalakovaný z dôvodu fixácie vzorky.

Následne sme vzorky pozorovali a fotili pomocou svetelného mikroskopu Axio Scope.A1 Zeiss, napojeného na program AxioVision SE64 Rel. 4.9.1. Tento program bol využitý aj na počítanie a meranie veľkosti peľových zrniek.

1.6 Spracovanie výsledkov

Spracovanie výsledkov sme vykonávali v programoch Microsoft Excel a PowerPoint. Grafické výstupy v obrázkoch 3,5,6,7 a 8 sa vytvárali a vyhodnocovali v štatistickom programe R 4.3.1.

2 Výsledky a diskusia

V tejto kapitole si podrobne zhrnieme dosiahnuté výsledky pri vykonávaní výskumu.

2.1 FCM analýzy materských rastlín a semenáčikov

Celkovo sme zmerali relatívny obsah DNA prostredníctvom DAPI prietokovej cytometrie pre 20 materských rastlín a 249 semenáčikov.

Relatívny obsah DNA (RSS) pre materské rastliny z tetraploidnej populácie (Humenné) bol 1,457 – 1,485, pri druhej tetraploidnej populácií (Chľaba) bol relatívny obsah DNA 1,388 – 1,451. Hodnoty DNA obsahu pre pentaploidnú populáciu sa zaznamenali v rozmedzí 1,764-1,792.

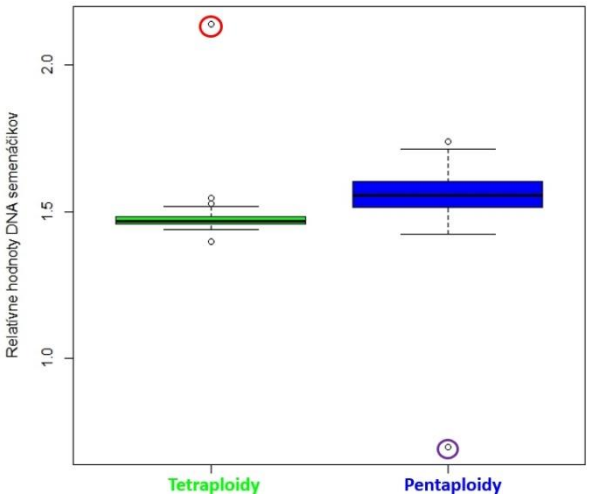
Podľa relatívneho obsahu DNA tetraploidných semenáčikov (Humenné) ich bolo možné priradiť k tetraploidnému stupňu, ich hodnoty RSS sa pohybovali v rozmedzí 1,439 – 1,546. Rovnaký prípad platí z veľkej miery aj pre druhú tetraploidnú populáciu (Chľaba), s hodnotami 1,398 – 1,527. Pri pentaploidnej populácií (Stropkov) sme zaznamenali variabilnejšie hodnoty od 1,422 – 1,739, ktoré boli v rozmedzí hodnôt medzi 4x až 5x (Tab. 1).

Zaujímavým zistením bola prítomnosť hexaploidného jedinca (RSS 2,141) v tetraploidnej populácii (Chľaba_8) a diploidného jedinca (RSS 0,697) v pentaploidnej populácii (Stropkov_24). (Tab. 1, Obr.3).

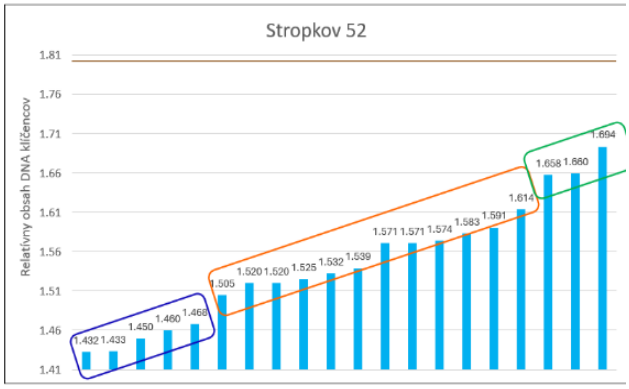
V pentaploidných populáciách sme zaznamenávali variabilné RSS hodnoty (Obr. 4), čo poukazuje na poruchy v samičej gametogenéze pri tvorbe vajcovej bunky a tým aj tvorbu aneuploidných jedincov.

Tab. 1 Namerané hodnoty RSS pre materské rastliny a semenáčiky

Materská rastlina			Semenáčiky	
Kód rastliny	Relatívny obsah DNA (RSS)	Ploidia	Relatívny obsah DNA (RSS), priemer; min-max (počet)	Ploidia
SOL_G_Humenne_1	1.480	4x	1,466; 1,449-1,497 (10)	4x
SOL_G_Humenne_3	1.479	4x	1,474; 1,451-1,498 (10)	4x
SOL_G_Humenne_5	1.469	4x	1,474; 1,452-1,508 (10)	4x
SOL_G_Humenne_8	1.485	4x	1,477; 1,456-1,518 (10)	4x
SOL_G_Humenne_10	1.457	4x	1,478; 1,439-1,546 (10)	4x
SOL_G_Chlaba_3	1.438	4x	1,476; 1,457-1,527 (10)	4x
SOL_G_Chlaba_6	1.394	4x	1,474; 1,459-1,498 (10)	4x
SOL_G_Chlaba_8	1.451	4x	1,543; 1,454-2,141 (10)	4x,6x
SOL_G_Chlaba_9	1.442	4x	1,455; 1,445-1,467 (10)	4x
SOL_G_Chlaba_10	1.338	4x	1,450; 1,398-1,468 (10)	4x
SOL_G_Stropkov_17	1.788	5x	1,605; 1,559-1,662 (5)	4x-5x
SOL_G_Stropkov_24	1.775	5x	1,503; 0,697-1,684 (20)	2x,4x, 4x-5x
SOL_G_Stropkov_52	1.792	5x	1,545; 1,658-1,694 (20)	4x, 4x-5x,5x
SOL_G_Stropkov_58	1.791	5x	1,528; 1,484-1,637 (20)	4x, 4x-5x
SOL_G_Stropkov_68	1.778	5x	1,546; 1,470-1,739 (20)	4x, 4x-5x, 5x
SOL_G_Stropkov_74	1.764	5x	1,575; 1,475-1,686 (20)	4x, 4x-5x, 5x
SOL_G_Stropkov_75	1.789	5x	1,571; 1,422-1,684 (20)	4x, 4x-5x, 5x
SOL_G_Stropkov_76	1.784	5x	1,584; 1,480-1,715 (21)	4x, 4x-5x, 5x
SOL_G_Stropkov_100	1.766	5x	1,612; 1,523-1,681 (3)	4x, 4x-5x, 5x
SOL_G_Stropkov_111	1.764	5x		



Obr.3 Rozsah RSS hodnôt semenáčikov z tetraploidných a pentaploidných materských rastlín. Tetraploidné semenáčiky (N = 100) a pentaploidné semenáčiky (N = 149). Hexaploidný jedinec, nájdený v potomstve materskej rastliny Chľaba_8 (RSS 2,141) – červená farba; diploidný jedinec, nájdený nájdený v potomstve materskej rastliny Stropkov _24 (RSS 0,697) – fialová farba



Obr.4 Výsledné FCM hodnoty relatívneho obsahu DNA semenáčikov z materskej rastliny Stropkov_52. Hnedá čiara indikuje RSS hodnotu materskej rastliny (1,792). Tmavomodrou farbou je vyznačených 5 semenáčikov, ktoré sa blížili k tetraploidii), 12 aneuploidných semenáčikov (oranžová farba) a 3 semenáčiky, blížiace sa k pentaploidii (tmavozelená farba)

2.2 Produkcia a veľkosť semien

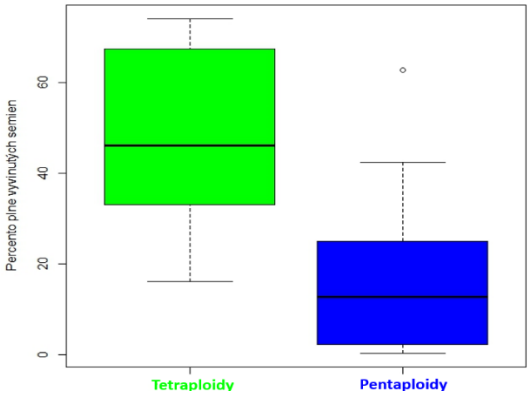
Stanovením podielu dobre vyvinutých a prázdnych semien (seed set) sme determinovali úroveň samičej plodnosti. Tento podiel sa stanovil pri každej z 20 materských rastlín. Celkovo sme po vytriedení zaznamenali 1299 plne vyvinutých semien pri 4x a 576 pri 5x. Celkový počet prázdnych semien za tetraploidný cytotyp bol 1587 a za pentaploidný cytotyp - 3093.

Percentuálny podiel plne vyvinutých semien pre jednotlivé materské rastliny sa pri 4x cytotype pohyboval od 16 % - 74 %. Pri 5x cytotype bol tento podiel a tým aj produkcia o niečo nižšia, podiel varíroval od 0,3 % - 42 % (Obr. 5). Použitím Welchovho aproximatívneho t-testu sa zistil významný štatistický rozdiel (p = 0,006 < 0,05) v produkcii semien oboch cytotypov, pričom produkcia semien bola pri pentaploidných materských rastlinách nižšia. Tieto výsledky poukazujú na vyššiu mieru samičej plodnosti pri tetraploidnom cytotype *S. gigantea*.

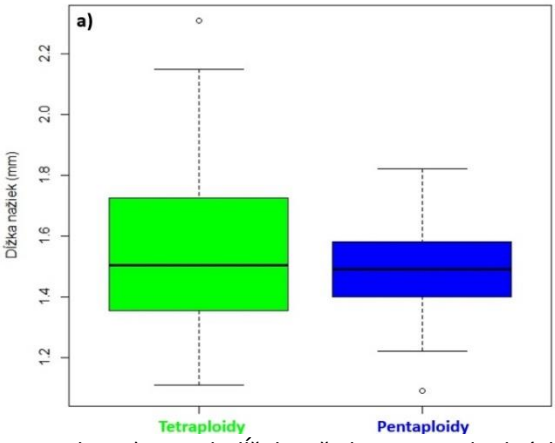
Pri dĺžke nažiek za tetraploidný cytotyp bol zaznamenaný rozsah od 1,11 – 2,31 mm. Dĺžka nažiek pri pentaploidoch varírovala od 1,09 – 1,82 mm (Obr.6a). Šírka nažiek pri tetraploidoch sa pohybovala v rozmedzí 0,30 – 0,56 mm.

Rozpätie šírky pri pentaploidoch varírovalo od 0,32 – 0,59 mm (Obr.6b).

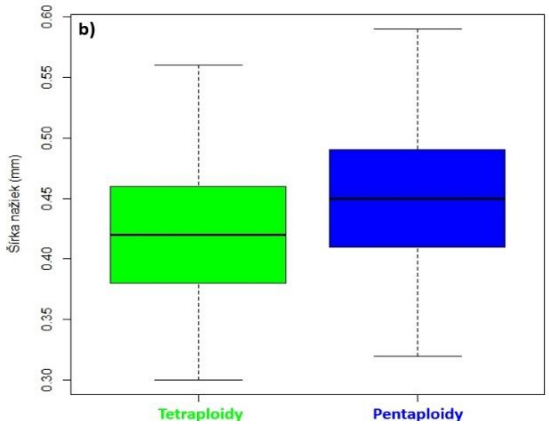
Pri dĺžkach nažiek sa nepreukázal významný štatistický rozdiel (p = 0,049 > 0,01), rozdiely pri šírkach boli štatisticky významné (p = 0,0001 = 0,01). Rastliny s vyššou úrovňou ploidie by mali produkovať väčšie a ťažšie semená [3,19,20], v našej práce sme však pri vyššom ploidnom stupni nezaznamenali výrazne väčšie semená. Uvedené môže zodpovedať výsledkom meraní veľkosti genómu potomstva, pretože len málo z nich zodpovedalo pentaploidii.



Obr.5 Percentuálne zastúpenie plne vyvinutých semien pri tetraploidnom (N=1299) a pentaploid nom cytotype (N=576).



Obr.6a) Rozsah dĺžok nažiek pri tetraploidných (N=100) a pentaploidných rastlinách (N=86).

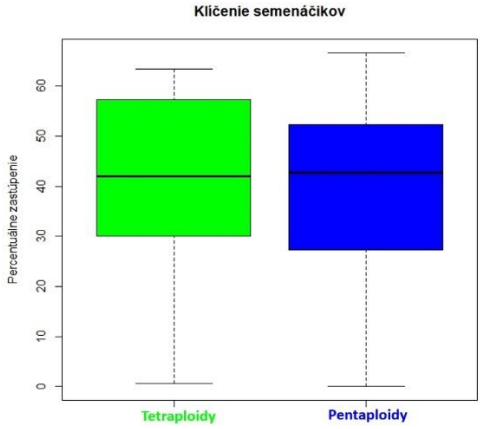


Obr.6b) Rozsah šírok nažiek pri tetraploidných (N = 100 a pentaploidných rastlinách (N=86).

2.3 Klíčivosť semien

Celkovo vyklíčilo 1108 semenáčikov, pričom 675 za tetraploidný a 433 za pentaploidný cytotyp. Percentuálny rozsah klíčivosti pri tetraploidnom cytotype bol 8,6 % - 63 %, pri pentaploidnom bol 28,00 % - 67 % (Obr. 7). Použitím Welchovho aproximatívneho t-testu sa nezistil významný štatistický rozdiel v klíčivosti porovnávaných cytotypov (p=0,395 > 0,05).

Semená z pentaploidných materských rastlín nemali nižšiu klíčivosť ako tetraploidné semená, nepozorovali sme pri nich ani vyššiu úmrtnosť. Ich rast bol výrazne pomalší a tieto semenáčiky boli zakrpatené. Ich prežívanie v prírode je otázne, vzhľadom na to, že väčšina potomstva z pentaploidných rastlín bola aneuploidná. Tieto jedince boli pre *Solidago gigantea* zaznamenané vo voľnej prírode len veľmi zriedkavo [13]. V budúcnosti by bolo potrebné experimentálne overiť, či bude potomstvo pentaploidných rastlín prežívať a dostane sa do štádia dospelých kvitnúcich rastlín.



Obr.7 Percentá klíčivosti tetraploidného a pentaploidného cytotypu

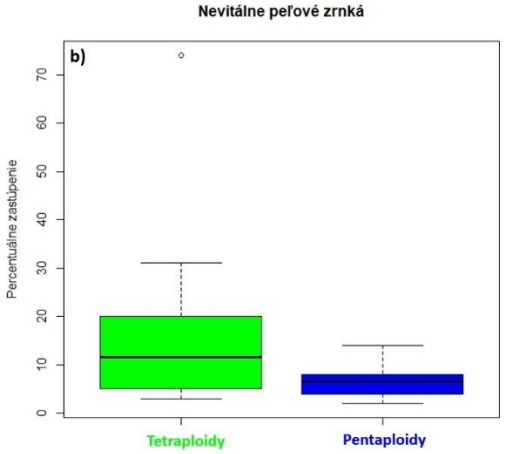
2.4 Analýzy peľu

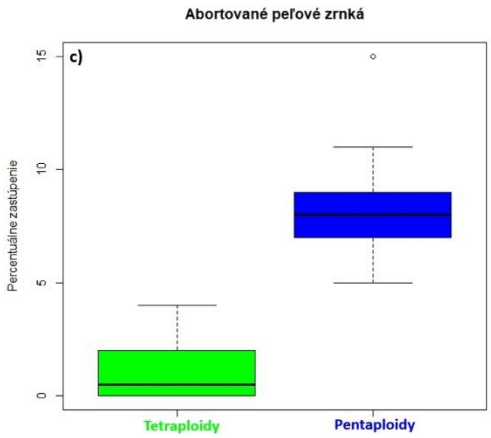
Z hľadiska životaschopnosti peľových zrniek sa pozorovali tri rôzne kategórie: vitálne peľové zrnká; nevitálne peľové zrnká a abortované peľové zrnká. Percentuálny rozsah vitálnych peľových zrniek pre 4x bol 69 % - 97 % a 78 % - 90 %; pri nevitálnych sa pri 4x pozoroval rozsah 3 % - 31 % pre 4x a 2 % - 14 % pri 5x. Pri abortovaných bol rozsah 0 % – 4 % pre 4x a 5 % - 11 % pre 5x.

Po vykonaní Welchovho aproximatívneho t-testu medzi percentuálnymi zastúpeniami vitálnych peľových zrniek sa nepreukázal významný štatistický rozdiel (p = 0,58 > 0,05). Rovnako sa nepreukázal štatistický rozdiel ani pri nevitálnych peľových zrnkách (0,12 > 0,05). Zato pri poslednej kategórií sa preukázal významný štatistický rozdiel (p =0,00001 < 0,05).

Zistenie, že tetraploidný cytotyp oproti pentaploidnému cytotypu produkuje vyššie percento vitálneho peľu, podporujú zistenia autorov pri druhu zvonček okrúhlolisý (*Campanula rotundifolia*) L. [21].

Pri pentaploidnom cytotype podstatne častejšie dochádza k viacerým genetickým mutáciám a následným poruchám v samčej gametogenéze, kedy dochádza k zvýšenej tvorbe malých, abortovaných peľových zrniek [22].



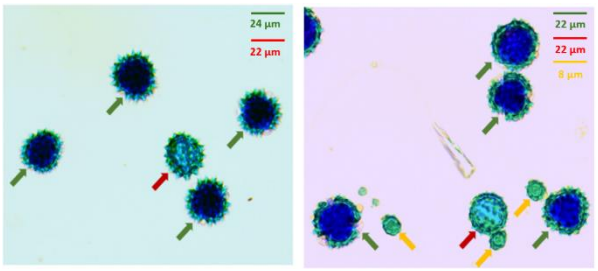


Obr.8a Percentuálne zastúpenie vitálnych peľových zrniek pri tetraploidoch (N=806) a pri pentaploidoch (N=845).

Obr.8b Percentuálne zastúpenie mŕtvych peľových zrniek pri tetraploidoch (N=184) a pri pentaploidoch (N=68).

Obr.8c Percentuálne zastúpenie abortovaných peľových zrniek pri tetraploidoch (N=10) a pri pentaploidoch (N=87).

Pri analýzach peľu sme nepozorovali žiadne výrazné zmeny v tvare peľových zrniek ani pri jednom cytotype (Obr. 9). Peľové zrnká mali izopolárny, kruhovitý tvar so systémom trikolpátnych otvorov a echinátnou perforovanou exinou. Pri pentaploidných vitálnych peľových zrnkách sme pozorovali takmer podobné rozsahy veľkostí peľových zrniek ako pri tetraploidoch.



Obr.9 Peľové zrnká za tetraploidnú rastlinu (Chľaba_8, vľavo) a pentaploidnú rastlinu (Stropkov_17, vpravo), spolu s mierkami jednotlivých kategórií peľových zrniek. Vitálne peľové zrnká – zelená šípka, neživé peľové zrnká – červená šípka, abortované peľové zrnká – žltá šípka
[autor: K. Skokanová]

Záver

Hlavným cieľom tohto príspevku bolo zistiť a následne porovnať reprodukčné parametre u tetraploidného a novoobjaveného, pentaploidného cytotypu invázneho, nepôvodného druhu *S. gigantea*.

Výsledky potvrdzujú predpoklad, že u pentaploidov dochádza k poruchám v samčej a pravdepodobne aj v samičej gametogenéze. U pentaploidných materských rastlín bola zaznamenaná zvýšená tvorba nevitálneho, či abortovaného peľu. Podobne, zhodnotením podielu dobre vyvinutých a nevyvinutých semien sa nám potvrdil predpoklad, že pentaploidné jedince mali nižšiu produkciu semien oproti tetraploidným populáciám.

Avšak aj pentaploidné rastliny produkujú početné semená s relatívne vysokou klíčivosťou. Výsledky analýzy relatívneho obsahu DNA u semenáčikov ukázali vysokú variabilitu, ktorá môže byť dôsledkom porúch gametogenézy pri tvorbe peľových zrniek ako aj vajcovej bunky, ktoré vedú k vzniku aneuploidných jedincov. Pretože takéto RSS hodnoty boli zistené v prírode pri podrobnom skríningu populácií iba veľmi zriedkavo, je pravdepodobné, že v priebehu rastu dochádza k uhynutiu veľkej časti aneuploidných semenáčikov pochádzajúcich z pentaploidných materských rastlín.

Prekvapivým momentom bola detekcia jedného hexaploidného jedinca v tetraploidnej populácií a jedného diploidného jedinca v pentaploidnej populácií. Tieto ploidné úrovne neboli doposiaľ v introdukovanom areáli pre *S. gigantea* zaznamenané, pričom môžu hrať dôležitú úlohu pri vzniku nových cytotypov.

Zistenia o zníženej úrovni ako samčej a tak aj samičej plodnosti pri pentaploidných rastlinách poukazujú na zníženú efektivitu sexuálneho rozmnožovania tohto cytotypu a menšiu pravdepodobnosť šírenia sa vo voľnej prírode pomocou semien. Avšak zároveň ju nemožno vylúčiť. Určitým rizikom môže byť produkcia vitálneho peľu, ktorý môže vstupovať do interakcie s bežne sa vyskytujúcimi tetraploidnými rastlinami *S. gigantea*. Oproti tomu tetraploidný cytotyp dosiahol zvýšené hodnoty v porovnávaných parametroch, čo vysvetľuje jeho inváznu úspech a predurčuje ho na prežívanie a šírenie sa v nepôvodnom areáli.

Poďakovanie

Táto práca bola podporená grantmi VEGA 2/0024/23 a APVV-19-0134.

Použitá literatúra

[1] HULL-SANDERS, Helen M. – JOHNSON, Robert H. – OWEN, Heather A et al. 2009 : Effects of Polyploidy on secondary chemistry, physiology, and

performance of native and invasive genotypes of *Solidago gigantea* (Asteraceae). In American Journal of Botany, Vol. 94, no. 4, pp. 762-770. ISSN 1537-2197.

[2] MARTINO, Maria – SEMPLE, John C. – BECK, James B. et al. 2020. Two cytotype niche shifts are of different magnitude in *Solidago gigantea*. In American Journal of Botany, Vol. 107, no. 11, pp. 1567-1576. ISSN 1537-2197.

[3] te BEEST, Mariska – Le ROUX, Johannes J. – RICHARDSON, David M. et al. 2012. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. In Annals of Botany, Vol. 109, no. 1, pp. 19-45. ISSN 1095-8290.

[4] SOLTIS, Pamela S. – SOLTIS, Douglas E. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. In Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 97, no. 13, pp. 7051-7057. ISSN 1091-6490.

[5] SKOKANOVÁ, Katarína – ŠPANIEL, Stanislav – ŠINGLIAROVÁ, Barbora et al. 2023. Constrasting invasion patterns of two closely related Solidago alien species. In Journal of Biogeography, Journal of Biogeography [Manuscript submitted for publication].

[6] MAYROSE, Itay – ZHAN, Shing H. – ROTHFELS, Carl J. et al. 2011. Recently formed polyploid plants diversify at lower rates, Vol. 333, no. 6047, pp. 1257. ISSN 0036-8075.

[7] ROSCHE, Christoph – DURKA, Walter – HENSEN, Isabell et al. 2016. The population genetics of the fundamental cytotype-shift in Centaurea stoebe s.l.: genetic, diversity, genetic differentation and small-scale genetic structure differ between cytotypes but not between ranges. In Biological Invasions, Vol. 18, no. 7. pp. 1895-1910. ISSN 1573-1464.

[8] *Solidago canadensis* (Canadian Goldenrod) [online]. *CABI Compedium* Wallingford : CABI International. 2021a. [cit.5.3.2024]. Dostupné z: https://www.cabi.org/isc/datasheet/50599

[9] *Solidago gigantea* (Giant Goldenrod). [online]. CABI Compedium Wallingford : CABI Internationl. 2021b. [cit.5.3.2024]. Dostupné z: https://www.cabi.org/isc/datasheet/50575

[10] SEMPLE, John C. – MCMINN-SAUDER, Harper – STOVER, Melissa. 2023. Goldenrod herbariomics: Hybrid sequence capture reveals the phylogeny of Solidago. In American Journal of Botany. Vol. 110, no. 7. ISSN 1537-2197.

[11] SEMPLE, John C. – COOK, Rachel E. Solidago. Flora of North America : North of Mexico. In Flora of North America Editorial Commitee, (ed.) Oxford, New York : Oxford University Press, 2006, 107-166. ISBN 978-0195057133.

[12] SCHLAEPFER, Daniel R. – EDWARDS, Peter J. – SEMPLE, John C. et al. 2008. Cytogeography of *Solidago gigantea* (Asteraceae) and its invasive ploidy level. In Journal of Biogeography, Vol. 35, no. 11, pp. 2119-2127. ISSN 1365-2699.

[13] SKOKANOVÁ, Katarína – ZOZOMOVÁ-LIHOVÁ, Judita – MEREĎA, Jr., Pavol et al. 2024. Not as boring as expected: The first reports of triploids, pentaploids and aneuploids of the invasive alien Solidago gigantea species revealed by detailed karyological examination in Central Europe. Annals of Botany [Manuscript submitted for publication].

[14] SCHLAEPFER, Daniel R. – EDWARDS, Peter – BILLETER, Regula. 2010. Why only tetraploid Solidago gigantea (Asteraceae) became invasive: a common garden comparision of ploidy levels. In Oecologia, Vol. 163, no. 3. pp. 671-673. ISSN 1432-1939.

[15] DOLEŽEL, Jaroslav – GREILHUBER, Johann – SUDA, Jan. 2007. Flow Cytometry with Plant Cells. Weinheim : Wiley-VCH , pp. 480. ISNB 978-3-527-31487-4.

[16] TEMSCH, Eva – GREILHUBER, Johann – KRASAI, Robert. 2010. Genome size in liverworts. In Preslia, vol. 82, no. 1. pp. 63-80. ISSN 2570-950X.

[17] SKOKANOVÁ, Katarína – ŠINGLIAROVÁ, Barbora – ŠPANIEL, Stanislav et al. 2022. Relative DNA content differences reliably identify Solidago ×niederederi, a hybrid between native and invasive alien species. In Preslia, vol. 94, no. 1, pp. 183-213. ISSN 2570-950X.

[18] PETERSON, Ross – SLOVIN, Janet P. – CHEN, Changbin. 2010. A Simplified Method for Differential Staining of Aborted and Non-Aborted Pollen Grains. In International Journal of Plant Biology, vol. 1, no. 2. ISSN 2037-0164.

[19] CHAN, Jason C. S. – OOI, Mark K. J. – GUJA, Lydia K. 2022. Polyploidy but Not Range Size is Associated With Seed and Seedling Traits That Effect Performance of Pomaderris Species. In Frontiers of Plant Science, vol. 12. ISSN 1664-462X.

[20] PESKOLLER, Andrea – SILBERNAGL, Lisa – HÜLBER, Karl. 2021.Do Pentaploid Hybrids mediate gene flow between tetraploid *Senecio disjunctus* and hexaploid *S. carniolicus* s. str. (*S. carniolicus* agg. Asteraceae? In Alpine Biology, vol. 131, pp. 151-

160. ISSN 1664-221X.
[21] SUTHERLAND, Brittany & GALLOWAY, Laura F. 2016. Postzygotic isolation varies by ploidy level Within a polyploid complex. In New Phytologist, vol. 213, no. 1, pp. 404-412. ISSN 1469-8137.
[22] BHATTACHARYA, Ashoke. Does pollen abortion increase with plant age? 2005. In Canadian Journal of Plant Science, vol. 85, pp. 151-153. ISSN 0008-4220.

Vplyv zloženia média na produkciu polyhydroxybutyrátu baktériou *Cupriavidus necator*

The influence of medium composition on polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator*

Soňa Ronďošová[1] – Daniela Chmelová[1] – Miroslav Ondrejovič[1]
Školiteľ: Daniela Chmelová[3]
[1]Oddelenie biotechnológií, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
rondosova2@.ucm.sk,daniela.chmelova@ucm.sk,miroslav.ondrejovic@ucm.sk

Abstrakt

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) predstavujú atraktívnu náhradu ku konvenčným plastom produkovaných z fosílnych zdrojov. Akumulácia PHA je zvyčajne reakcia na stresové podmienky, ktorým čelia bakteriálne bunky. *Cupriavidus necator* je vhodným kandidátom na biosyntézu PHA, konkrétne polyhydroxybutyrátu (PHB). Cieľom práce bol výber vhodného zloženia kultivačného média stimulujúceho produkciu biomasy ako aj PHB. Zistili sme, že vhodné podmienky produkcie biomasy *C. necator* sú koncentrácia glukózy 15 g/l, koncentrácia síranu amónneho 0,75 g/l a molarita fosfátového tlmivého roztoku 91 mmol/l. Pri týchto podmienkach sme pozorovali štvornásobný nárast množstva biomasy v porovnaní so zložením média odporúčaným literatúrou. V prípade média stimulujúceho produkciu PHB navrhujeme zvoliť koncentráciu glukózy 10 g/l, koncentráciu síranu amónneho 0,25 g/l a molaritu fosfátového tlmivého roztoku 30 mmol/l, pričom sme pozorovali až 51,4 % výťažok PHB. Z našich výsledkov vyplýva, že je vhodnejšie voliť dvojkrokovú produkciu PHB, pričom v prvom kroku sa produkuje biomasa a až následne žiadaný metabolit v médiu indukujúcom jeho tvorbu.

Kľúčové slová: polyhydroxyalkanoáty, polyhydroxybutyrát, *Cupriavidus necator*, zloženie média

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) represent an attractive alternative to conventional plastics produced from fossil sources. The accumulation of PHAs is usually in response to stress conditions faced by bacterial cells. *Cupriavidus necator* is a suitable candidate for the biosynthesis of PHAs, specifically polyhydroxybutyrate (PHB). The aim of this work was to select a suitable culture medium composition to stimulate both biomass and PHB production. We found that suitable conditions for *C. necator* biomass production were a glucose concentration of 15 g/l, an ammonium sulphate concentration of 0.75 g/l, and a phosphate buffer molarity of 91 mmol/l. Under these conditions, we observed a 4-fold increase in the amount of biomass compared to the literature-recommended medium composition. A glucose concentration of 10 g/l, an ammonium sulphate concentration of 0.25 g/l and a phosphate buffer molarity of 30 mmol/l would be suitable for a medium stimulating PHB production, and we observed up to 51.4 % PHB yield. Our results suggest that it is preferable to choose a two-stage PHB production, with the first stage producing biomass and then the desired metabolite in a medium whose composition induces its formation.

Key Words: polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrate, *Cupriavidus necator*, medium composition

Úvod

Takzvané konvenčné plasty sú syntetické a polysyntetické polymérne zlúčeniny, ktoré sa vyrábajú hlavne z fosílnych zdrojov uhlíka, ako je ropa alebo zemný plyn. Keďže tieto plasty sú odolné voči biologickému rozpadu predstavujú problém pre životné prostredie. Riešením sú práve bioplasty, ktoré sú produkované z prírodných zdrojov a biomasy. Polyhydroxyalkanoáty (PHA) predstavujú atraktívnu náhradu ku konvenčným plastom produkovaných z fosílnych zdrojov [1].

Rôzne druhy baktérií intracelulárne akumulujú PHA ako zásobu energie a uhlíka vo vnútri ich buniek. Jedným z efektívnych producentov je práve baktéria *Cupriavidus necator*. *C. necator* bol hlavne skúmaný kvôli produkcii PHB, pretože má vynikajúcu schopnosť akumulovať značné množstvo tohto biopolyméru a to až do 80 % hmotnosti suchej bunkovej hmoty [2].

Produkcia PHA v mikroorganizmoch je zložitý proces a je ovplyvnený živinami a faktormi životného

prostredia. Na zlepšenie produkcie PHA bolo realizovaných veľa výskumných aktivít, konkrétne na pochopenie úlohy pomeru C/N, zložiek kultivačného média, prenosu kyslíka a účinkov miešania na akumuláciu PHA [3, 4]. Akumulácia PHA je zvyčajne reakcia na stresové podmienky, ktorým čelia bakteriálne bunky. Práve obmedzením dusíka dochádza k zmene metabolických dráh v baktérii, čím sa uprednostňuje konverzia uhlíkového zdroja na PHA viac ako na bunkové zložky. Dôležitosť zdroja dusíka pre produkciu PHA spočíva v jeho úlohe pri podpore rastu buniek, regulácii syntézy PHA, ovplyvňovaní pomeru C/N a pri celkovej účinnosti biosyntézy PHA. Okrem toho aj ďalšie zložky kultivačného média ovplyvňujú produkciu PHB ako je zdroj uhlíka, fosforu, horčíka a ďalších.

Preto je cieľom tejto práce zistiť vplyv zložiek kultivačného média ako aj ich koncentrácií na produkciu biomasy *C. necator* ako aj na množstvo PHB produkovaného intracelulárne v bunkách tejto baktérie.

1 Materiál a metódy

V tejto kapitole si opíšeme materiály, ktoré budeme používať vo výskume ako aj všetky potrebné postupy, bez ktorých by sa náš výskum nezaobišiel.

1.1 Produkčný mikroorganizmus

Použitý bol bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* DSM 545 získaný zo Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Leibniz (Nemecko). Kultúra bola uchovávaná pri 4 °C na mäsopeptónovom agare (MPA) s 1,0 % (w/v) prídavkom agaru. Bakteriálne bunky boli preočkované v 7-dňových intervaloch na MPA a kultivované pri 30 °C. Inokulum, ktoré sme použili na zaočkovanie médií sme pripravili nasledovne: do 3 ml sterilnej destilovanej vody sme rozmiešali mikrobiologickým očkom 3-dňovú kultúru *C. necator* tak, aby výsledná hodnota McFarrlandovych jednotiek bola v rozmedzí 0,8 – 0,9. Túto zmes sme sterilne preliali do 30 ml mäsopeptónového bujónu (MPB), ktorý bol kultivovaný cez noc pri 30 °C za dynamických podmienok. Následne sme zaočkovali médium v pomere 40:1 (v/v).

1.2 Kultivačné médium

Zloženie kultivačného média vychádzalo z literatúry [5]. Kultivačné médium obsahovalo glukózu (5,0 g/l) vybraný anorganický zdroj dusíka (síran amónny, dusičnan amónny, dusičnan draselný, fosforečnan sodno-amónny a chlorid amónny) (4,0 g/l); $K_2HPO_4.12H_2O$ (5,8 g/l); KH_2PO_4 (3,7 g/l); $MgSO_4.7\ H_2O$ (0,25 g/l). Vplyv koncentrácie glukózy ako zdroja uhlíka (1,0 – 20,0 g/l), síranu amónneho ako zdroja dusíka (0,1-20,0 g/l), síranu horečnatého (0,025 – 0,625 g/l) a molarita fosfátového tlmivého roztoku (11,0 – 151,0 mmol/l) boli testované ako faktory potenciálne ovplyvňujúce množstvo PHB produkované biomasou *C. necator*. Kultivácia sa uskutočňovala za dynamických podmienok počas 48 hodín pri 30 °C a počiatočnom pH 7,0.

1.3 Stanovenie sušiny biomasy

Po ukončení kultivácie bolo médium premiestené do centrifugačných skúmaviek. Zmes sa centrifugovala 20 minút pri 4000 RPM. Biomasa bola od supernatantu oddelená dekantáciou. Následne bola biomasa premytá 5 ml destilovanej vody a opäť centrifugovaná 20 minút pri 4000 RPM. Biomasa bola od vody oddelená dekantáciou. Mokrá biomasa bola sušená pri 50 °C do konštantnej hmotnosti a vyjadrená ako zvyšková biomasa po odčítaní množstva PHB stanoveného pomocou GC-FID v mg.

1.4 Stanovenie PHB pomocou GC-FID

Množstvo PHB bolo stanovené pomocou plynovej chromatografie s plameňovo-ionizačným detektorom (GC-FID). 15 ml chloroformu bolo pridaných k suchej biomase rozdrvenej kovovými guličkami. Extrakcia prebiehala 24 hodín pri laboratórnej teplote pri 150 RPM. Po uplynutom čase bola zmes prefiltrovaná, chloroform bol vysušený síranom sodným, zmes znovu prefiltrovaná a chloroform bol z extraktu odparený na rotačnej vákuovej odparke.

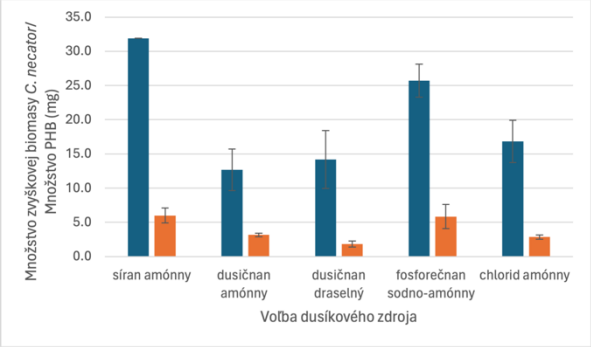
Získaný odparok bol rozpustený v 2 ml chloroformu. K zmesi sa pridali 2 ml okysleného metanolu s 3 % (v/v) kyselinou sírovou a zmes bola derivatizovaná počas 1 hodiny pri 100 °C. Po ochladnutí bol k zmesi pridaný 1 ml destilovanej vody a po ustálení rovnováhy odpipetovaný 1 ml chloroformovej vrstvy. Vzorka bola dávkovaná v objeme 2 µl. Nástrekový ventil bol nastavený na 250 °C, tlak 43 kPA s prietokom nosného plynu (dusík) 116,3 mol/min. Split bol nastavený na 100:1. Vzorka sa separovala na kolóne RTX-1 pri tlaku 43 kPa a rýchlosťou prietoku 1,1 ml/min. Teplota kolóny bola nastavená na 80 °C počas 1 minúty, následne stúpala o 10 °C/min až do teploty 150 °C a o 20 °C/min do teploty 280 °C, ktorá bola držaná 5 minút. Detektor mal 270 °C a koncentrácia PHB bola hodnotená na základe kalibračnej krivky pripravenej zo štandardu PHB ($y = 104,55x – 1,7855$; $R^2 = 0,9982$).

1.5 Štatistické metódy

Výsledky boli vyhodnotené pomocou Microsoft Excel (2019), pričom všetky merania ako aj kultivácie prebiehali v troch paralelných meraniach.

2 Výsledky a diskusia

C. necator je gramnegatívna baktéria vyskytujúca sa v pôde a v sladkej vode. Vo svojich bunkách dokáže syntetizovať PHA s krátkym reťazcom, najmä PHB. Mikrobiálna produkcia PHA pomocou tejto baktérie je založená na obmedzení množstva dusíka a naopak prítomnosti zvýšeného množstva uhlíka [6]. V úvode tejto práce sme sa zamerali najskôr na výber vhodného zdroja dusíka tak pre produkciu biomasy ako aj množstvo PHB, nakoľko sú odporúčania v literatúre rôzne. Ako zdroj dusíka sme vybrali síran amónny, dusičnan amónny, dusičnan draselný, fosforečnan sodno-amónny a chlorid amónny. Ich vplyv sme hodnotili na množstvo PHB a množstvo zvyškovej biomasy *C. necator*, ktorú sme získali po odpočítaní množstva PHB stanoveného pomocou GC. Výsledky sú uvedené v Grafe 1.

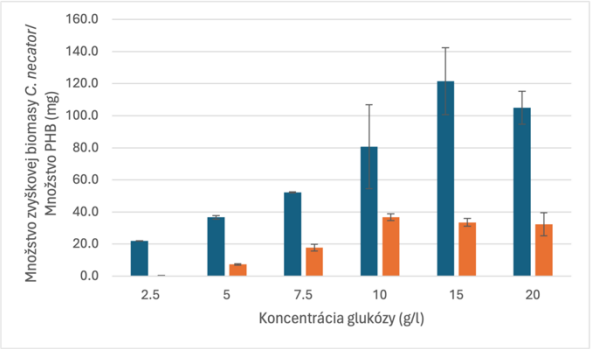


Graf 1: Vplyv voľby zdroja dusíka na množstvo zvyškovej biomasy *C. necator* (■) a množstvo PHB (■) vyjadrené v mg

Najvyššie množstvo zvyškovej biomasy *C. necator* sme pozorovali pri sírane amónnom a to konkrétne hmotnosť 31,9 ± 0,01 mg (Graf 1). Vyššie množstvo biomasy (25,7 ± 2,4 mg) sa nachádzalo aj v médiu s fosforečnanom sodno-amónnym. Na Grafe 1 je viditeľné, že ostatné zdroje dusíka nedosahovali tak vysoké množstvá biomasy *C. necator*, kedy sa jej množstvá pohybovali v rozsahu 12,7-16,8 mg. Produkcia biomasy *C. necator* je dôležitým ukazovateľov aj pre priemyselnú produkciu PHB, nakoľko, že vo väčšom množstvo biomasy producenta sa bude akumulovať väčšie množstvo PHB.

Taktiež sme zhodnotili aj množstvo PHB v bunkách *C. necator*, pričom sme pozorovali, že najlepším zdrojom dusíka na produkciu PHB bol síran amónny. Hoci literatúra uvádza, že najvhodnejším zdrojom dusíka na produkciu PHB je chlorid amónny [6, 7] v našom prípade sme v médiu obsahujúcom tento zdroj dusíka naprodukovali 2,8 ± 0,3 mg PHB. Z výsledkov sa javí, že najvhodnejší výber zdroja dusíka v kultivačnom médiu pre *C. necator* DSM 545 je, vzhľadom na oba sledovaného faktory, síran amónny (Graf 1).

Následne po výbere vhodného zdroju dusíka sme sa zamerali na výber vhodnej koncentrácie zložiek kultivačného média s cieľom maximálnej produkcie tak biomasy *C. necator,* ako aj množstva PHB. Najskôr sme otestovali vplyv koncentrácie zdroja uhlíka glukózy v rozsahu 2,5 – 20 g/l na hodnotené premenné (Graf 2).

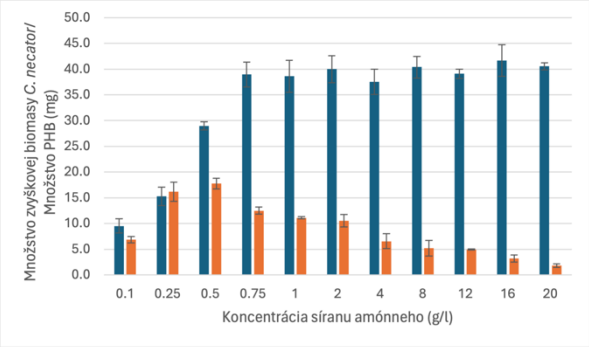


Graf 2: Vplyv koncentrácie glukózy (g/l) na množstvo zvyškovej biomasy *C. necator* (■) a množstvo PHB (■) vyjadrené v mg

Z výsledkov je zrejmé, že vyššia koncentrácia stimulovala produkciu biomasy *C. necator* ako aj produkciu PHB. Najvyššie množstvo zvyškovej biomasy sme pozorovali pri koncentrácii 15 g/l glukózy (121,5 ± 20,9 mg). Množstvo PHB však bolo najvyššie pri koncentrácii glukózy 10 g/l (36,8 ± 2,1 mg), čo predstavuje 37,4 % výťažok. Pri koncentrácii 15 g/l bolo množstvo PHB len mierne nižšie (33,5 ± 2,4 mg), avšak výťažok PHB bol 24,1 % vyjadrený na celkové množstvo získanej biomasy C. *necator*. Z výsledkov preto vyplýva, že najvhodnejšia koncentrácia glukózy pre množstvo biomasy je 15 g/l, zatiaľ čo pre množstvo PHB je to 10 g/l (Graf 2). Toto naznačuje pravdepodobnú potrebu dvojkrokovej kultivácie *C. necator*, pričom v prvom kroku sa zameriame na produkciu biomasy a až následne upravíme médium tak, aby jeho zloženie indukovalo produkciu PHB. Rovnako tento záver potvrdila aj priemyselná produkcia PHB touto baktériou, kedy využili dvojstupňový fed-batch systém kultivácie, pričom v prvom stupni rástla baktéria na

glukóze v propagačnom médiu a následne sa produkoval PHB alebo kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) v médiu obsahujúcom vhodný zdroj uhlíka ako kyselina propiónová [7, 8].

V nasledujúcom experimente sme sa zamerali na varírovanie koncentrácie síranu amónneho a jeho vplyv na zvyškovú biomasu *C. necator* ako aj množstvo PHB. Túto zložku sme varírovali v rozsahu 0,1 – 20 g/l (Graf 3).

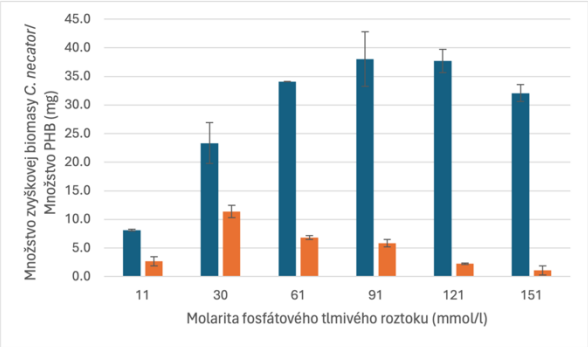


Graf 3: Vplyv koncentrácie síranu amónneho (g/l) na množstvo zvyškovej biomasy *C. necator* (■) a množstvo PHB (■) vyjadrené v mg

Najvhodnejšia koncentrácia pre množstvo biomasy *C. necator* je 0,75 g/l (38,9 ± 2,4 mg). V prípade zvyšujúcej sa koncentrácie sme už nepozorovali nárast množstva biomasy, čo mohlo byť spôsobené aj vyčerpaním zdroja uhlíka, ktorý sme nastavili z úvodného zloženia kultivačného média z literatúry na 5 g/l. Zaujímavejšie výsledky však pozorujeme v prípade hodnotenia množstva PHB. Najvyššiu hodnotu tohto parametra sme pozorovali pri koncentrácii 0,5 g/l (17,8 ± 1,0 mg), čo predstavuje 38 % výťažok. Avšak najvyšší výťažok PHB pozorujeme v prípade koncentrácie 0,25 g/l a to 51,4 %. Tento výsledok opätovne naznačuje nutnosť dvojkrokovej kultivácie *C. necator.* Je vo všeobecnosti známe, že produkcia PHA je stimulovaná vysokou koncentráciou uhlíkového a naopak nízkou koncentráciou dusíkového zdroja, čo potvrdzujú až naše výsledky (Graf 2, Graf 3).

V ďalšom experimente sme hodnotili molaritu fosfátového tlmivého roztoku použitého na udržanie stabilného pH kultivačného média, ale aj ako zdroj fosforu a draslíka. Výsledky sú uvedené v Grafe 4.

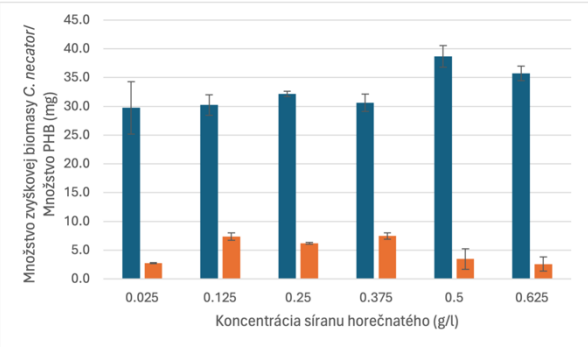
Najvyššie množstvo biomasy *C. necator* sme zaznamenali pri 91 mmol/l fosfátovom tlmivom roztoku (38,0 ± 4,08 mg), avšak najvyššie množstvo PHB bolo namerané v médiu s molaritou fosfátového tlmivého roztoku 30 mmol/l a to 11,4 ± 1,1 mg, čo predstavuje aj najvyšší získaný výťažok 31,4 %. Pri molarite fosfátového tlmivého roztoku 91 mmol/l, ktorý stimuloval produkciu biomasy, sme zaznamenali výťažok 14,2 %. Podobne Mohan a Reddy [9] zistili, že zvýšená koncentrácia fosforu vedie k rýchlej syntéze proteínov, zatiaľ čo jeho nedostatok znižuje túto rýchlosť a ovplyvňuje množstvo biomasy ako aj PHA.



Graf 4: Vplyv molarity fosfátového tlmivého roztoku (mmol/l) na množstvo zvyškovej biomasy *C. necator* (■) a množstvo PHB (■) vyjadrené v mg

Fosfor je dôležitou zložkou rôznych bunkových súčastí ako sú fosfolipidy, nukleové kyseliny, proteíny, enzýmy a podieľa sa aj na bunkovej energetike [3]. Znovu sme potvrdili predpoklad, že podmienky vyhovujúce produkcii PHB nie sú vhodné podmienky pre produkciu biomasy.

Poslednou hodnotenou zložkou média bol heptahydrát síranu horečnatého v koncentračnom rozsahu 0,025 – 0,625 g/l (Graf 5).



Graf 5: Vplyv koncentrácie síranu horečnatého (g/l) na množstvo zvyškovej biomasy *C. necator* (■) a množstvo PHB (■) vyjadrené v mg

Po vysušení biomasy *C. necator* sme zistili, že jej hodnota sa po odpočítaní naprodukovaného PHB pohybovala v rozsahu 29,7 – 35,8 mg. Môžeme tvrdiť že koncentrácia síranu horečnatého nemala významný

vplyv na množstvo vyprodukovanej biomasy aj pri zohľadnení smerodajných odchýlok v jednotlivých experimentoch, avšak ovplyvnila množstvo naprodukovaného PHB. Najvyššie množstvo sme zaznamenali pri koncentrácii síranu horečnatého v rozsahu 0,125 – 0,375 g/l, pričom najvyšší výťažok sme pozorovali pri koncentrácií 0,375 g/l a to 19,6 %. Je zrejmé, že síran horečnatý je významný faktor pre produkciu PHB a z pohľadu množstva biomasy je nutná jeho prítomnosť, avšak nemusí byť vo vysokých koncentráciách.

Záver

Z výsledkov vyplýva, že najvhodnejším zdrojom pre produkciu tak biomasy *C. necator* ako aj PHB bol síran amónny. Na efektívnu produkciu PHB je nutné voliť dvojkrokovú kultiváciu, pričom zloženie média stimulujúceho produkciu biomasy by bolo nasledovné: koncentrácia glukózy 15 g/l, koncentrácia síranu amónneho 0,75 g/l a molarita fosfátového tlmivého roztoku 91 mmol/l. V prípade média stimulujúceho produkciu PHB by bolo vhodné zvoliť koncentráciu glukózy 10 g/l, koncentráciu síranu amónneho 0,25 g/l a molaritu fosfátového tlmivého roztoku 30 mmol/l. Vzhľadom na výsledky v prípade síranu horečnatého by bolo v oboch prípadoch vhodné využiť koncentráciu 0,375 g/l. Aj vzhľadom na tento záver ako aj na skutočnosť, že vhodné podmienky pre biomasu *C. necator* ako aj PHB produkované touto baktériou majú relatívne blízke hodnoty koncentrácií jednotlivých zložiek, bolo by zaujímavé otestovať možnosť optimalizácie týchto hodnôt pomocou metódy odozvovej plochy. Spomínané najvhodnejšie koncentrácie jednotlivých zložiek by boli využité ako hranice optimalizácie pri zostavovaní optimalizačnej matice, čoho výsledkom by mohlo byť zvýšenie množstva biomasy so súčasnou vysokou produkciou PHB v jednom kultivačnom médiu, avšak tento predpoklad vyžaduje ešte ďalšie štúdie.

Poďakovanie

Táto práca bola vypracovaná s podporou projektu APVV-18-0420 Biotechnologická príprava bioplastov na báze PHA s programovaným uvoľňovaním biopolyméru a možnosti jeho využitia.

Použitá literatúra

[1] GÓMEZ, Eddie F. – MICHEL, Frederik C. 2013. Biodegradability of conventional and bio-based plastics and natural fiber composites during composting, anaerobic digestion and long-term soil incubation. In Polymer Degradation and Stability, vol. 98, no. 12, pp. 2583-2591. ISSN 0141-3910.

[2] SOHN, Yu Jung et al. 2021. Chemoautotroph *Cupriavidus necator* as a potential game-changer for global warming and plastic waste problem. In Bioresource Technology, vol. 340, 125693. ISSN 0960-8524.

[3] BHATIA, Shashi Kant et al. 2021. Biowaste-to-bioplastic (polyhydroxyalkanoates): Conversion technologies, strategies, challenges, and perspective. In Bioresource Technology, vol. 326, 124733. ISSN 0960-8524.

[4] SRUAMSIRI, Donhatai et al. 2020. *In situ* identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-accumulating microorganisms in mixed microbial cultures under feast/famine conditions. In Scientific Reports, vol. 10, pp. 3752. ISSN 2045-2322.

[5] CHMELOVÁ, Daniela et al. 2022. Optimization of propagation medium for enhanced polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas oleovorans*. In Fermentation, vol. 8, no. 1, pp. 16. ISSN 2311-5637.

[6] BHATIA, Shashi Kant et al. 2018. Production of (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) copolymer from coffee waste oil using engineered *Ralstonia eutropha*. In Bioprocess and Biosystems Engineering, vol. 41, pp. 229-235. ISSN 1615-7605.

[7] YANG, Yung-Hun et al. 2010. Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from acids by *Ralstonia eutropha*. In Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 87, pp. 2037-2045. ISSN 1432-0614.

[8] KIM, Beom Soo et al. 1994. Production of poly(3-hydroxybutiric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. In Biotechnology and Bioengineering, vol. 43, no. 9, pp. 892-898. ISSN 1097-0290.

[9] DU, Guocheng C. et al. 2001. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. In Biochemical Engineering Journal, vol. 8, no. 2, pp. 103-110. ISSN 1369-703X.

[10] MOHAN, S. Venkata – REDDY, M. Venkateswar. 2013. Optimization of critical factors to enhance polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis by mixed culture using Taguchi design of experimental methodology. In Bioresource Technology, vol. 128, pp. 409-416. ISSN 0960-8524.

FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED UNIVERZITY MATEJA BELA

UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED A INFORMATIKY

Sekcia

Biotechnológie

Produkcia polyhydroxybutyrátu pomocou halofilnej baktérie *Halomonas halophila*

Production of polyhydroxybutyrate by halophilic *bacteria Halomonas halophila*

Zuzana Baťová[1] – Daniela Chmelová[1] – Miroslav Ondrejovič[1]
Oddelenie biotechnológií, FPV UCM, Nám. J. Herdu, 917 01 Trnava
batova3@ucm.sk, daniela.chmelova@ucm.sk, miroslav.ondrejovic@ucm.sk

Abstrakt

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) predstavujú potenciálnu náhradu v súčasnosti využívaných komerčných plastov produkovaných z ropy. Je možné ich produkovať pomocou rôznych baktérií, avšak zaujímavým producentom sa javí byť baktéria druhu *Halomonas halophila.* V tejto práci sme sa zamerali na efektívnu produkciu polyhydroxybutyrátu (PHB) pomocou baktérie *H. halophila* CCM 3662 v produkčnom médiu. Využitím Plackett-Burmanovho dizajnu sme identifikovali zdroj uhlíka (glukóza), zdroj dusíka ($(NH_4)_2SO_4$), Na_2HPO_4 a NaCl ako kľúčové zložky média potrebné pre produkciu PHB. Vhodne upravenou metodikou stanovenia PHB pomocou plynovej chromatografie sme v tomto médiu stanovili 49,6±1,8 % PHB.

Kľúčové slová: polyhydroxyalkanoáty, baktérie, polyhydroxybutyrát, bioplasty, halofily

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) represent a potential replacement for currently used commercial plastics produced from petroleum. These can be produced by a variety of bacteria, but *Halomonas halophila* appears to be an interesting producer. In this work, we have focused on the efficient production of polyhydroxybutyrate (PHB) using *H. halophila* CCM 3662 in a production medium. Using the Plackett-Burman design, we identified carbon source (glucose), nitrogen source ($(NH_4)_2SO_4$), Na_2HPO_4 and NaCl as the key components of the medium required for PHB production. By a suitably modified gas chromatography method of PHB determination, we estimated 49.6±1.8 % PHB in this medium.

Key Words: polyhydroxyalkanoates, bacteria, polyhydroxybutyrate, bioplastics, halophiles

Úvod

Záujem o vývoj biorozložiteľných plastov, zaznamenaný v posledných rokoch, je spôsobený najmä zmenou klimatických podmienok a snahou znížiť zaťaženie životného prostredia nerozložiteľnými plastami produkovanými z ropy [1-4]. Preto je potrebné nahradiť tento neobnoviteľný zdroj inými alternatívnymi, prioritne obnoviteľnými surovinami. Viaceré biopolyméry, sa vyrábajú fermentačnými procesmi prírodných surovín, akými sú pšenica, kukurica, cukrová repa, ryža, zemiaky a sója. Špecifická spotreba na jednotku vyrobeného biorozložiteľného plastu sa líši v závislosti od použitej suroviny, avšak aj v prípade využitia obnoviteľných zdrojov je treba uvažovať o ich výbere. Suroviny, ktoré sú primárne pestované ako zdroj obživy, by mohli spôsobiť zvýšenie nákladov na potraviny [5]. Z tohto hľadiska je zrejmé, že vývoj bioplastov si vyžaduje používanie menej hodnotných surovín, ako sú odpady z poľnohospodárstva alebo potravinárstva. Ekonomicky výhodná produkcia bioplastov a ich využívanie tiež súvisí aj s problémom likvidácie komerčných plastov a ich hromadením v životnom prostredí. Tradičné plasty podliehajú degradačným javom s veľmi pomalou kinetikou, zatiaľ čo bioplasty vykazujú vyššiu mieru rozkladu na skládkach [6, 7].

Jedným z potenciálnych kandidátov na náhradu konvenčných plastov sú práve polyhydroxyalkanoáty (PHA). PHA sú uhlíkovo neutrálne a hodnotné polyméry produkované mikroorganizmami z mnohých obnoviteľných zdrojov uhlíka, čo z nich robí udržateľný a ekologický materiál. V súčasnosti nie je produkcia PHA z hľadiska nákladov konkurencieschopná v porovnaní s produktami získanými z fosílnych palív. Preto je snahou znížiť celkovú cenu produkcie PHA pomocou relatívne lacného média obsahujúceho napríklad odpady vznikajúce v poľnohospodárstve alebo potravinárstve. Avšak najskôr je potrebné poznať požiadavky producenta PHA na zloženie média

a následne je možné vhodnou úpravou postupne znižovať cenu produkcie PHA voľbou lacnejších zdrojov uhlíka alebo dusíka. Medzi producentov PHA patria aj halofilné druhy baktérií, ktorých spoločným znakom je, že vyžadujú prostredie s vysokou koncentráciou solí. Ich výber ako producentov PHA má niekoľko výhod medzi ktoré patria nižšie nároky na sterilitu prostredia, ľahšia izolácia bioplastu z buniek indukovaná len zmenou osmotického tlaku alebo tiež možnosť využiť aj odpady s vysokou koncentráciou solí ako sú kyslo hydrolyzované lignocelulózové materiály alebo srvátka [8, 9].

Cieľom tejto práce je zistiť podmienky produkcie biomasy baktérie druhu *Halomonas halophila* ako aj podmienky produkcie polyhydroxybutyrátu (PHB) v médiu odporúčanom literatúrou a pomocou Plackett-Burmanovho štatistického modelu overiť potrebu jednotlivých zložiek média.

1 Materiál a metódy

V tejto kapitole si bližšie opíšeme použité mikroorganizmy ako aj metódy, ktoré využijeme pri výskume.

1.1 Mikroorganizmus a kultivácia

H. halophila CCM 3662 sme zakúpili z Českej zbierky mikroorganizmov Ústavu experimentálnej biológie Masarykovej univerzity (Brno, Česká republika). *H. halophila* bol kultivovaný na mäsopeptónovom agare (MPA) s 1 % (*w/v*) prídavkom agaru a chloridom sodným v koncentrácii 66 g/l. Inokulum bolo pripravené z trojdňovej kultúry rozmiešaním mikrobiologického očka do 50 ml CNM média v nasledovnom zložení: peptón 15 g/l, kvasničný extrakt 3 g/l, glukóza 1 g/l a NaCl 66 g/l. Takto pripravenú zmes sme použili na prípravu glycerínových konzerv v zložení 625 µl 80 % (v/v) glycerínu a 372 µl inokulačného média. Pripravené glycerínové konzervy s optickou denzitou 600 nm sme uskladnili pri teplote -20 °C. Na predkultiváciu mikroorganizmu sme využili 50 ml CNM média zaočkovaného jednou glycerínovou konzervou. Po 24 hodinovej dynamickej kultivácií pri 30 °C sme z tohto média očkovali produkčné médium (MM) troma percentami inokula.

1.2 Príprava produkčného média

Pri práci sme používali živné médium (MM) v zložení: glukóza (20 g/l), $(NH_4)_2SO_4$ (3 g/l), KH_2PO_4 (1 g/l), $Na_2HPO_4 .12H_2O$ (11,1 g/l), $MgSO_4 .7H_2O$ (0,2 g/l), NaCl (66 g/l) a roztok so stopovými prvkami v zložení: $FeCl_3$ (9,7 g/l), $CaCl_2$ (7,8 g/l), $CuSO_4 .5H_2O$ (0,156 g/l), $CoCl_2$ (0,199 g/l), $NiCl_2$ (0,118 g/l) rozpustené v HCl (0,1 mol/l) [10-12]. Pre identifikáciu prítomnosti vybraných komponentov sme využili Plackett-Burmanov štatistický model založený na absencii vybranej zlúčeniny. Návrh experimentu je zaznamenaný v Tabuľke 1.

Tabuľka 1 Znázornenie zloženia kultivačných médií pri Plackett-Burmanovom štatistickom modeli

Exp.	Zloženie média						
	Glukóza	$(NH_4)_2SO_4$	KH_2PO_4	$Na_2HPO_4 .12 H_2O$	$MgSO_4$	NaCl	Stopové prvky
1	-	+	+	+	+	+	+
2	+	-	+	+	+	+	+
3	+	+	-	+	+	+	+
4	+	+	+	-	+	+	+
5	+	+	+	+	-	+	+
6	+	+	+	+	+	-	+
7	+	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

Vysvetlivky: + prítomnosť alebo - absencia vybraného komponentu média

Kultivácia prebiehala 72 hodín, dynamicky pri 30 °C a pH 7,0. V prípade nutnosti bolo pH média upravené kyselinou fosforečnou. V kultivačných médiách sme stanovili koncentráciu zvyškovej glukózy (g/l) pomocou DNS metódy podľa Millera [13] a množstvo biomasy gravimetrickým stanovením. Následne sme biomasu použili na stanovenie schopnosti *H. halophila* produkovať PHA, najmä PHB.

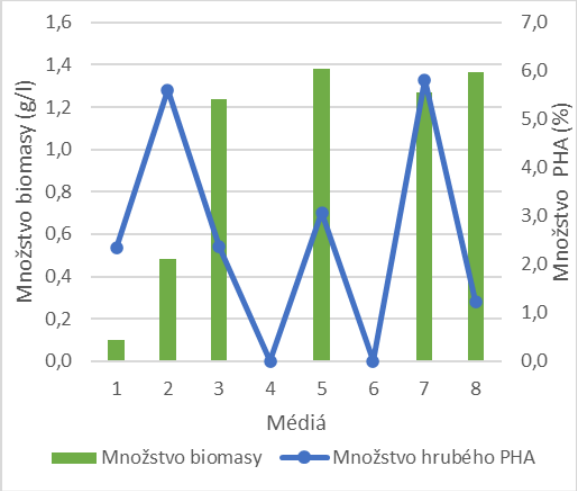
1.3 Izolácia a stanovenie PHA

Kultivačné médium sme po 72 hodinovej kultivácii centrifugovali po dobu 20 minút pri 4000 RPM. Supernatant sme dekantáciou oddelili od biomasy. Ku biomase sme pridali 5 ml destilovanej vody a znovu centrifugovali 20 minút pri 4000 RPM a následne odstránili supernatant dekantáciou. Biomasu sme spracovali vysušením do konštantnej hmotnosti pri 50 °C, potom sme suchú biomasu zhomogenizovali kovovými guličkami na vortexe po dobu 30 sekúnd, pridali 5 ml chloroformu a zmes sme nechali extrahovať dynamicky na trepačke, pri laboratórnej teplote po dobu 24 hodín. Zmes sme vysušili bezvodým síranom sodným, prefiltrovali cez skladaný filter do destilačných baniek a odparili do sucha na rotačnej vákuovej odparke. Po odparení sme vzniknuté hrubé PHA odvážili na analytických váhach a vyhodnotili v percentách vztiahnutých na množstvo biomasy.

Hrubý extrakt PHA sme rozpustili pomocou chloroformu (2 ml). K zmesi sme napipetovali 2 ml kyslého metanolu (3 % (v/v)), depolymerizovali a derivatizovali pri 100 °C počas 1 hodiny. Po vychladnutí zmesi sme pridali 1 ml destilovanej vody a zmes nechali ustáliť 24 hodín. Následne sme odpipetovali 1 ml spodnej chloroformovej fázy a stanovili PHB pomocou plynovej chromatografie (GC) s plameňovo-ionizačným detektorom (FID).

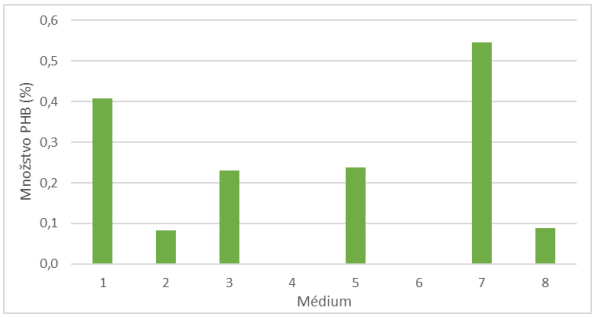
2 Výsledky a diskusia

H. halophila CCM 3662 patrí medzi halofily vyžadujúce si prítomnosť kyslíka pre ich rast a rozmnožovanie. Základné zloženie média (MM) vychádzalo z literárneho prehľadu zameraného na produkciu PHB baktériou *H. halophila* [10-12, 14]. V úvode sme využili Plackett-Burmanov dizajn s cieľom identifikácie kľúčových zložiek média pre rast baktérie *H. halophila* ako aj produkciu PHA. Výsledky sú uvedené v Grafe 1.



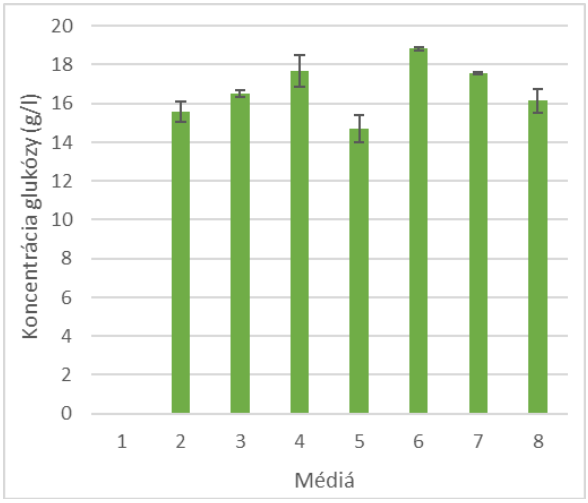
Graf 1 Množstvo biomasy (g/l) a množstvo hrubého PHA (%) stanovených po ukončení kultivácie *H. halophila* v médiách s absenciou vybranej zložky MM. Zloženie je uvedené v Tabuľke 1.

Na základe výsledkov uvedených na Grafe 1 môžeme konštatovať, že neprítomnosť glukózy (Médium 1), síranu amónneho (2), hydrogénfosforečnanu sodného (4) a chloridu sodného (6) mala významne negatívny vplyv na množstvo biomasy. Naopak neprítomnosť dihydrogénfosforečnanu draselného (3), síranu horečnatého (5) ako aj roztok stopových prvkov (7) zjavne nemala zásadný vplyv na produkciu biomasy. Dôležitým poznatkom je však pomerne nízka produkcia PHA, stanovená gravimetricky ako hrubé množstvo PHA, vzhľadom na množstvo biomasy v kompletnom médiu, z čoho je očividné, že niektoré zložky média *baktérii H. halophila* vyslovene bránia v produkcií PHA. Tento záver potvrdila aj GC-FID analýza (Graf 2).



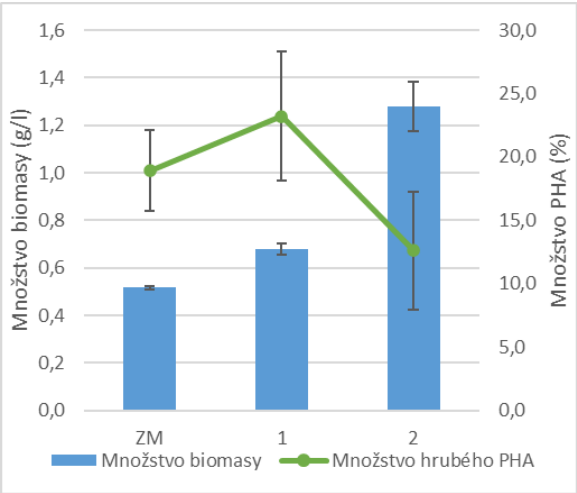
Graf 2 Množstvo PHB (%) v médiách stanovené pomocou GC-FID vztiahnuté na gram biomasy. Zloženie je uvedené v Tabuľke 1.

Na základe výsledkov v Grafe 2 sme zistili, že najviac PHB bolo produkovaných v médiu, ktoré neobsahovalo stopové prvky (7). Taktiež z média, ktoré neobsahovalo dihydrogénfosforečnan draselný (3) a síran horečnatý (5) bola baktéria schopná produkovať väčšie množstvo PHB. Zároveň sa potvrdil negatívny vplyv neprítomnosti hydrogénfosforečnanu sodného (4) aj chloridu sodného (6), keďže v týchto médiách sme nezaznamenali žiadne PHB. Nevhodne nastavené zloženie média bežne využívaného pre *H. halophila* CCM 3662 vybraného na základe literárnej rešerše [11-12, 14] potvrdzuje aj spotreba glukózy po ukončení kultivácie (Graf 3).



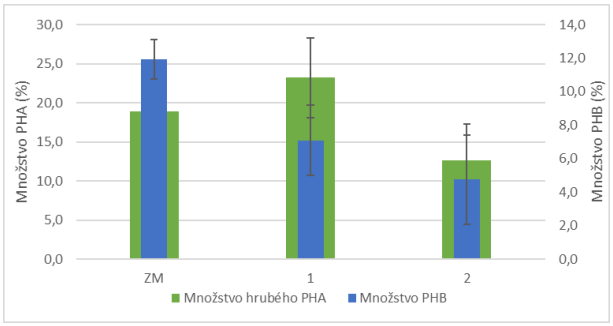
Graf 3 Koncentrácia zvyškovej glukózy stanovená po ukončení kultivácie *H. halophila* v médiách s absenciou vybranej zložky. Zloženie je uvedené v Tabuľke 1.

Následne sme uskutočnili experiment, kde sme *H. halophila* kultivovali v základnom médiu (ZM) obsahujúcom štyri základné esenciálne zložky potrebné na produkciu biomasy ako aj PHA na základe výsledkov z Plackett-Burmanovho modelu (Graf 1) a to glukózu (20 g/l), síran amónny (3 g/l), hydrogénfosforečnan sodný (11,1 g/l) a chlorid sodný (66 g/l). Z výsledkov Plackett-Burmanovho štatistického modelu je však zaujímavé, že v médiu nie je nutná prítomnosť síranu horečnatého alebo dihydrogénfosforečnanu draselného. Ióny horčíka pôsobia ako základné kofaktory pre určité enzýmy zapojené do biosyntézy PHA. Tieto enzýmy, ako je PHA syntáza, vyžadujú pre svoju správnu aktivitu a funkciu Mg^{2+}. Horečnaté ióny môžu pomôcť stabilizovať štruktúru enzýmu a uľahčiť polymerizáciu monomérov počas produkcie PHA [15-16]. Dihydrogénfosforečnan draselný pôsobí ako zložka tlmivého roztoku, ktorý pomáha udržiavať požadované pH média. Odoláva zmenám kyslosti alebo zásaditosti, čím vytvára stabilnejšie prostredie pre rast baktérií. Dihydrogénfosforečnan draselný tiež poskytuje zdroj draselných (K^+) a fosfátových (PO_4^{3-}) iónov, ktoré sú základnými živinami pre rast a metabolizmus baktérií. Draselné ióny pôsobia ako cytoplazmatické signálne molekuly, ktoré aktivujú a/alebo indukujú enzýmy a transportné systémy, ktoré umožňujú bunke prispôsobiť sa zvýšenej osmolarite [17]. A preto sme taktiež overili vplyv prítomnosti KH_2PO_4 (1) a $MgSO_4$ (2) v ďalších dvoch experimentoch, aby sme potvrdili, či skutočne nie sú potrebné v základnom médiu (ZM) a ich neprítomnosť nebude mať negatívny vplyv na množstvo biomasy alebo produkciu PHA. Výsledky sú uvedené na Grafe 4.



Graf 4 Množstvo biomasy (g/l) a množstvo hrubého PHA (%) stanovené po ukončení kultivácie *H. halophila* v základnom médiu (ZM) a v ZM s prídavkom dihydrogénfosforečnanu draselného (1) alebo ZM s prídavkom síranu horečnatého (2).

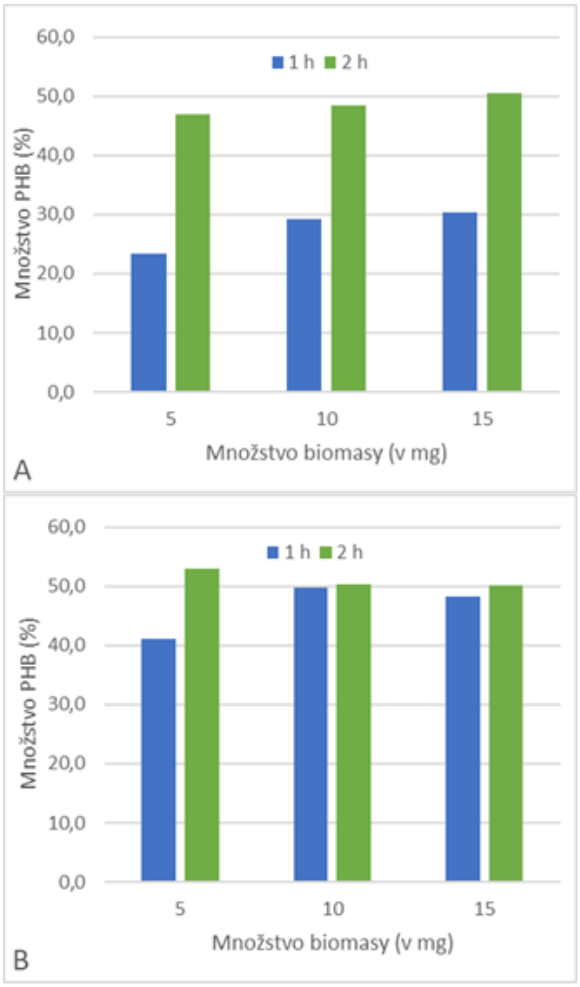
Z výsledkov vyplýva (Graf 4), že prítomnosť vybraných zložiek nemala významne negatívny efekt na množstvo biomasy alebo množstvo hrubého PHA (ZM). Prítomnosť síranu horečnatého (1) mala však pozitívny účinok na množstvo biomasy, keďže sme zaznamenali 2,5-krát vyšší výťažok, avšak zároveň sme pozorovali pokles množstva hrubého PHA a to 1,2-krát. Zároveň je však nutné konštatovať, že takto zostavené média stimulovali produkciu PHA, nakoľko ich množstvo vzrástlo štvornásobne, z pôvodne najvyššej hodnoty 5,8 % (Graf 1) na 23,2 % (Graf 4). Následne sme stanovili aj množstvo PHB pomocou GC-FID (Graf 5).



Graf 5 Množstvo získaného PHB v percentách vztiahnutých na gram biomasy v porovnaní množstva PHA v percentách.

Množstvo PHB bolo v médiách v rozsahu 4,7 – 11,9 %, čo predstavuje nárast o 23-krát pri najvyšších sledovaných hodnotách pre médium, ktorého zloženie vychádzalo z literatúry (Graf 2) a modifikovaného ZM (Graf 5). Vzhľadom na výsledky sme sa rozhodli ďalej pracovať so štvorzložkovým médiom obsahujúcim zdroj uhlíka (glukóza), zdroj dusíka (síran amónny) a tiež hydrogénfosforečnan sodný a chlorid sodný. V literatúre sa však výťažky PHB baktériou *H. halophila* pohybujú v množstvách od 40 – 80 % zo suchej hmotnosti biomasy v závislosti od kultivačných podmienok a uhlíkového zdroja [18]. Keďže počas rozpúšťania hrubého PHA získaného po extrakcii vysušenej biomasy *H. halophila* chloroformom sa vyskytli problémy s nedostatočnou rozpustnosťou niektorých častí odparku, realizovali sme experiment, kde sme overili možnosť priamej depolymerizácie a derivatizácie PHB zo suchej biomasy bez predchádzajúcej extrakcie s chloroformom a zároveň sme overili možnosť zvýšenia stanoveného množstva PHB zvýšením času depolymerizácie a derivatizácie

z pôvodnej jednej hodiny na dve hodiny a tiež koncentrácie kyslého metanolu používaného ako derivatizačné činidlo (z pôvodných 3 % (v/v) kyseliny sírovej v metanole na 6 % (v/v)). Varírovali sme tiež návažky biomasy a to v rozmedzí 5, 10 a 15 mg nakoľko sme pri produkcií získali rozdielne množstvá biomasy. Týmto spôsobom sme teda chceli overiť možnosť stanoviť PHB aj v zvýšenom množstve biomasy. Výsledky sú uvedené v Grafe 6.



Graf 6 Stanovenie množstva PHB (%) priamou depolymerizáciou a derivatizáciou biomasy (5, 10 a 15 mg) s kyselinou sírovou rozpustenou v metanole v koncentrácii A - 3 % (v/v) a B – 6 % (v/v) počas 1 a 2 hodín.

Zistili sme, že množstvo PHB je v biomase na úrovni približne 49,6 ± 1,8 %. Keďže sme biomasu produkovali v ZM, množstvo PHB bolo pred úpravou metodiky stanovenia PHB 11,9 % (Graf 5) je zrejmé, že problematickým krokom pri stanovení množstva PHB je jednak samotná extrakcia PHB z biomasy, pretože priamou derivatizáciou biomasy *H. halophila* sme získali 2,0- až 2,6-krát vyšší výťažok PHB (23,4 – 30,4 %) pri rovnakých podmienkach depolymerizácie a derivatizácie (1 hodina, 3 % (v/v) kyseliny sírovej v metanole) (Graf 6-A).

Avšak ďalším problematických krokom sú aj samotné podmienky depolymerizácie a derivatizácie. V prípade zvýšenia koncentrácie kyseliny sírovej v metanole z pôvodných 3 % (v/v) na 6 % (v/v) bolo pozorované ďalšie zvýšenie množstva PHB (41,0 – 50,3 %) ako aj predĺžením času depolymerizácie a derivatizácie z pôvodnej jednej hodiny na dve hodiny, v 3 % (v/v) kyseline sírovej v metanole (48,5 - 50,4 %). Z výsledkov uvedených na Grafe 6 je teda zrejmé, že je potrebné buď zvýšiť koncentráciu kyseliny sírovej pri zachovaní času derivatizácie na 6 % (v/v) alebo pri zachovaní koncentrácie H_2SO_4 (3 %, v/v) zvýšiť čas potrebný na depolymerizáciu a derivatizáciu PHB na dve hodiny.

V oboch prípadoch sme však zvýšili množstvo stanoveného PHB o približne 4,2-krát viac v porovnaní s úvodným stanovením PHB v ZM.

Záver

Pri produkcií PHA pomocou *H. halophila* je zásadným faktorom zloženie produkčného média. Využili sme preto Plackett-Burmanov dizajn s cieľom identifikácie kľúčových zložiek média pre rast baktérie *H. halophila* ako aj produkciu PHB. Vzhľadom na výsledky je zjavné, že na rast baktérie ako aj produkciu PHB je postačujúce štvorzložkové médium obsahujúce zdroj uhlíka (glukóza), zdroj dusíka (síran amónny) a tiež hydrogénfosforečnan sodný a chlorid sodný. Za týchto podmienok a po úprave podmienok izolácie a stanovenia PHB pomocou GC-FID sme získali 49,6 ± 1,8 %. PHB na gram biomasy.

Poďakovanie

Táto práca bola vypracovaná s podporou projektu APVV-18-0420 Biotechnologická príprava bioplastov na báze PHA s programovaným uvoľňovaním biopolyméru a možnosti jeho využitia.

Použitá literatúra

[1] ANDERSON, J. M. et al. 1998. Recent advances in biomedical polyurethane biostability and biodegradation. In Polymer International, vol. 46, no. 3, pp. 163-171. ISSN 1097-0126.

[2] ZHANG, J. Y. et al. 2000. A new peptide-based urethane polymer: Synthesis, biodegradation, and

potential to support cell growth *in vitro*. In Biomaterials, vol. 21, pp. 1247-1258. ISSN 1878-5905.

[3] GROSS, R. A. – KALRA, B. 2002. Biodegradable polymers for the environment. In Science, vol. 297, pp. 803-807. ISSN 1095-9203.

[4] DEMIRBAS, A. 2007. Biodegradable plastics from renewable resources. In Energy Sources Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects, vol. 29, no. 5, pp. 419-424. ISSN 1556-7230.

[5] HARDING, K. G. et al. 2007. Environmental analysis of plastic production processes: Comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically based poly-beta-hydroxybutyric acid using life cycle assessment. In Journal of Biotechnology, vol. 130, no. 1, pp. 57-66. ISSN 1873-4863.

[6] ISHIGAKI, T. et al. 2004. The degradability of biodegradable plastics in aerobic and anaerobic waste landfill model reactors. In Chemosphere, vol. 54, no. 3, pp. 225-233. ISSN 1879-1298.

[7] OBRUCA, S. et al. 2022. Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics. In Biotechnology Advances, vol. 58, pp. 107906. ISSN 0734-9750.

[8] OBRUCA, S. et al. 2014. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. In Process Biochemistry, vol. 49, no. 9, pp. 1409-1414. ISSN 1359-5113.

[9] OBRUCA, S. et al. 2015. Use of lignocellulosic materials for PHA production. In Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, vol. 29, no. 2 pp. 135-144. ISSN 1846-5153.

[10] KUCERA, D. et al. 2018. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. In Bioresource Technology, vol. 256, pp. 552-556. ISSN 1873-2976.

[11] KOVALCIK, A. et al. 2018. Influence of removal of microbial inhibitors on PHA production from spent coffee grounds employing *Halomonas halophila*. In Journal of Environmental Chemical Engineering, vol. 6, pp. 3495-3501. ISSN 2213-3437.

[12] KOURILOVA, X. et al. 2021. Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. In Bioresource Technology, vol. 325, 124704. ISSN 0960-8524.

[13] MILLER, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. In Analytical Chemistry, vol. 31, no. 3, pp. 426-428. ISSN 1520-6882.

[14] PERNICOVA, I. et al. 2019. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains. In Bioresource Technology, vol. 292, 122028. ISSN 0960-8524.

[15] ASENJO, JA. et al. 1995. Effect of single nutrient limitation of poly-beta-hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligens europhus*. In Biotechnology and Bioengineering, vol. 46, no. 5, pp. 497-502. ISSN 1097-0290.

[16] MADISON, L.L. – HUISMAN, G.W. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. In Microbiology and Molecular Biology Review, vol. 63, pp. 21-53. ISSN 10985557.

[17] EPSTEIN, W. 2003. The roles and regulation of potassium in bacteria. In Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, vol. 75, pp. 293-320. ISSN 0079-6603.

[18] PERNICOVA, I. et al. 2019. Extremophiles – platform strains for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. In Materials Science Forum, vol. 955, pp. 74-79. ISSN 1662-9752.

Využitie systému CRISPR-Cas9 pre štúdium funkcie vybraných génov u *Euglena gracilis*

Use of the CRISPR – Cas9 system to study the function of selected genes in *Euglena gracilis*

Terézia Blažeková[1] – Vanessa Gelanová[1] – Andrej Jedlička[1]
Školiteľ: Dominika Vešelényiová[1]
[1]Ústav biológie a biotechnológie – Oddelenie biológie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
blazekova4@ucm.sk, gelanova1@ucm.sk, jedlicka1@ucm.sk, dominika.veselenyiova@ucm.sk

Abstrakt

Euglena gracilis je jednobunkový voľne žijúci sladkovodný bičíkovec radiaci sa do triedy Euglenida (Euglenozoa, Discoba, Excavata). *E. gracilis* produkuje paramylon, ktorý je zložkou vysokohodnotných funkčných potravín a výživových doplnkov, je tiež sľubným biomateriálom pre potraviny, krmivá a biopalivá. CRISPR-Cas je prirodzený obranný mechanizmus mnohých baktérií. V súčasnosti sa tento systém využíva čoraz viac pri génových manipuláciách.

V našej práci sme sa venovali bioinformatickej analýze sekvencii génov kódujúcej enzým β- 1,3- glukán syntáza, ktorý *E. gracilis* využíva pri syntéze paramylonu. Vybranú sekvenciu sme analyzovali pomocou bioinformatických nástrojov, pre lepšie pochopenie jej štruktúry. Následne sme pripravili sekvencie pre špecifické primery a CRISPR-Cas9 transformáciu. Navrhovanie prebiehalo na C- terminálnom konci sekvencie, kde sme vložili aminokyselinovú sekvenciu dvoch za sebou idúcich HA- tagov, ktoré nám umožnia jednoduchšiu identifikáciu vzniknutých mutantov po transformácii. Cielená mutagenéza, ktorá ovplyvní zvýšenú produkciu paramylonu u tohto druhu je však dlhotrvajúcou výzvou.

Kľúčové slová: *Euglena gracilis*, paramylon, CRISPR-Cas9, *β* -1,3-glukán syntáza

Abstract

Euglena gracilis is a free-living freshwater flagellate from the class Euglenida (Euglenozoa, Discoba, Excavata). *E. gracilis* produces paramylon, which is a raw material for high-value functional foods and nutritional supplements; it is also a promising biomaterial for food, feed and biofuels. CRISPR-Cas system is a natural defence mechanism of many bacteria. This system is now increasingly used in gene manipulation.

In our work, we devoted ourselves to the bioinformatic analysis of the sequence encoding the enzyme *β*-1,3-glucan synthase, which the *E. gracilis* uses in the synthesis of paramylon. We analyzed the selected sequence using bioinformatics tools for a better understanding of its structure. Subsequently, we prepared sequences for specific primers and CRISPR-Cas9 transformation. Designing took place at the C-terminal end of the sequence, where we inserted the amino acid sequence of two consecutive HA-tags that will allow us to more easily identify the resulting mutants after transformation. However, targeted mutagenesis to affect increased paramylon production in this species is a long-standing challenge.

Key Words: Euglena gracilis, paramylon, CRISPR-Cas9, β -1,3-glucan synthase

Úvod

Bičíkovec *Euglena gracilis* môže rásť fotoautotrofne, heterotrofne a mixotrofne. Akumuluje rôzne metabolity, ako sú aminokyseliny, vitamíny, polynenasýtené mastné kyseliny a paramylon (β- 1,3- glukán) [1]. Paramylon má imunomodulačné, antialergické, protinádorové, anti-HIV a protiinfekčné funkcie, taktiež ma preukázateľný vplyv na znižovanie cholesterolu [1,2]. Preto sa stal súčasťou vysokohodnotných funkčných potravín a výživových doplnkov. Štúdium biotechnologického využitia paramylonu sa stále venuje značná pozornosť, keďže jeho potenciál vo využití v rôznych oblastiach je vysoký. *E. gracilis* ako modelový organizmus je dobre študovaný v rámci základných otázok vo vývoji chloroplastov a fotosyntéze s dôsledkami vo fyziológii, biochémii a bunkovej biológii. Výskum v oblasti bioinžinierstva a biotechnológií s využitím *E. gracilis*,

najmä pomocou úpravy genómu, však zostáva nedostatočný [3].

Japonskí vedci v roku 2019 publikovali úspešnú úpravu genómu sprostredkovanú systémom CRISPR-Cas9 (z angl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)/CRISPR-Associated Nuclease 9 (Cas9))* v *E. gracilis* pomocou elektroporácie Cas9 ribonukleoproteínov zacielených na gén *EgGSL2* zapojený do syntézy paramylonu. Skupine japonských vedcov pod vedením T. Nomura sa podarilo pomocou *ssODN* (*single stranded oligodeoxynucleotides*) včleniť úsek dlhý 42 nt do génu *EgGSL2.* Pomocou Sangeroveho sekvenovania *konck-in* cieľovej oblasti bolo identifikovaných 24 z 35 náhodne klonovaných produktov PCR, ktoré mali presnú *knock-in* sekvenciu odvodenú od navrhnutého ssODN v cieľovom mieste [4,5]. Tieto výsledky ukazujú, že ssODN-sprostredkované *knock-in* experimenty sú aplikovateľné na *E. gracilis*. V tejto práci bolo cieľom navrhnúť a vytvoriť *knock-in* 2xHA-tag sekvencie do génu produkujúceho paramylon (*EgGSL*). Vložený inzert nám poslúži pri identifikácii proteínov pomocou western blot, keďže existujú komerčne dostupné protilátky voči HA-tag.

1 Materiál a metódy

Práca bola rozdelená na dve časti. V prvej bioinformatickej časti (*in silico*) sme sa venovali návrhu komponentov pre transformáciu pomocou CRISPR-Cas9 (boli navrhnuté primery, CRISPR komponenty a detekčné primery).

1.1 *In silico* analýza

Vybraná sekvencia na *in silico* analýzu, sekvencia enzýmu β-1,3-glukán syntáza je podľa databázy CaAZy (http://www.cazy.org/search?page=recherche&recherche=gt48&tag=11) zaradená do rodiny glykozyltransferáz 48 (GT48). Je to proteínová rodina, ktorá prenáša glukózový zvyšok z UDP-glukózy na β- 1,3- D-glukán. Ten následne vytvára trojité špirály spájajúce sa do fibríl, ktoré vytvárajú paramylónové zrná. Vybraná sekvencia pochádza z transkriptómu [6] *E. gracilis* na základe bioinformatickej analýzy.

Pomocou bioinformatickej softvérovej platformy Geneious Prime sme vykonali *in silico* analýzu nami vybranej sekvencie. Po vytvorení genómovej a transkriptómovej knižnice [7] pre *E. gracilis,* sme pomocou funkcie BLAST našli sekvenčné podobnosti k záujmovej (QUERY) sekvencii v obidvoch týchto knižniciach. Následne sme vybrali po jednej sekvencii z každej knižnice, ktoré najlepšie korešpondujú (majú najväčšiu zhodu, konsenzus) k QUERY sekvencii. V zrovnaní sme vyznačili jednotlivé exóny, 5´UTR a 3´UTR oblasti, čím sme pripravili anotáciu génu.

Pomocou databázy *Conserved Domain Database* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) sme vizualizovali konzervované domény v sekvencii (Tab.1). Tento krok nám umožňuje vhodne navrhnúť vodiacu RNA (sgRNA), ktorá sa nemôže nachádzať priamo alebo v blízkosti konzervovanej domény, aby transformáciou nedošlo k porušeniu funkcie konzervovanej domény.

Tabuľka 1: Zoznam domén v sekvencii, získané z databázy CDsearch.

Názov	**ID domény**	**Interval (aminokyselinové zvyšky)**
Glukán syntáza	pfam02364	2 296 – 2 721
Int	PRK00302	2 936 – 3 064
LacZ	COG3250	156 – 349
Glykozid hydroláza	pfam02836	137 – 249

Pre editáciu sekvencie enzýmu β -1,3 glukán syntáza pomocou CRISPR-Cas9 boli nasyntetizované nukleotidové komponenty: (I) *single stranded oligodeoxynucleotides* (ssODN) a (II) *single-guide RNA* (sgRNA).

Pomocou programu Geneious Prime sme vyhľadali všetky potenciálne úseky na nasadenie a štiepenie CRISPR-Cas9, následne sme pomocou parametra lokalizácie aktivity podľa Doench *et al*., (2016) [8] a podľa parametra skóre špecifickosti podľa Zhang *et al*., (2013) [9] vybrali najlepší úsek pre nasadnutie CRISPR-Cas9 teda single-guide RNA (Tab.2). Transformácia génu bola navrhnutá na C-terminálnom konci sekvencie.

Tabuľka 2: Hodnoty špecificity a aktivity pre vybranú vodiacu RNA (sgRNA)

Sekvencia (sgRNA)	**Zhang (2013) Skóre špecificity**	**Doench (2016) Skóre aktivity**
GCTCCCAGAACGACC GCTGAGGG	98,57%	0,619

Single stranded oligodeoxynucleotides (ssODN) sa skladá z dvoch homologických ramien (pravé a ľavé) a inzertu, ktorý budeme vkladať do sekvencie enzýmu β-1,3-glukán syntáza. Homologické ramená začínajú na koncoch inzertu a sú dlhé 60 nt. Ako inzert sme si zvolili hemaglutinín ľudskej chrípky (HA-tag), ktorý budeme vkladať dvakrát za sebou (2xHA-tag).

Posledným krokom v *in silico* analýze bol návrh primerov. Celkovo bolo navrhnutých 7 primerov (Tab.3), z čoho 4 primery (2 páry) budú slúžiť na klasickú PCR a 3 primery sú detekčné primery, na detekciu vzniknutých mutantov po transformácii buniek *E. gracilis* pomocou CRISPR-Cas9 s využitím colony PCR analýzy.

2 Výsledky a diskusia

Prvým krokom bioinformatickej analýzy bola identifikácia sekvencie, vhodnej pre jej editáciu. Sekvenciu sme identifikovali v transkriptóme *E.* gracilis, pomocou analýzy Skrytým Markovým modelom. Dĺžka aminokyselinovej sekvencie použitej pre bioinformatickú analýzu je 3 089 aminokyselinových zvyškov a celková nukleotidová sekvencia predstavuje 9 267 bp. Gén pozostáva celkovo z 86 exónov.

Pre vloženie (*knock-in*) sekvencie 2xHA-tag do sekvencie β-1,3-glukán syntázy bola použitá metóda CRISRP-Cas9, ktorá už bola úspešne aplikovaná na *E. gracilis* [5]. Tento systém pozostáva zo *single guide RNA* (sgRNA) dlhej 23 bp komplementárnej k sekvencii, kam je nasmerovaná Cas9 endonukleáza, ktorá vytvorí v tomto mieste zlom dvojzávitnice DNA (DSB – *double strand break). sg*RNA sme navrhli so špecificitou 98,57% podľa Zhang [9], pričom percentuálne skóre off-target bolo 7,23%. Čím je hodnota *off-target* nižšia, tým je hodnota špecificity podľa Zhang [9] vyššia a je menšia pravdepodobnosť, že sa vytvorí dvojitý zlom mimo cieľového úseku. Skóre je zohľadnené nie len podľa identifikovaných off-target, v našej sgRNA bol identifikovaný 1 off-target, ale aj podľa nekomplementárnych báz a ich pozícii voči PAM (protospacer susedný motív) sekvencii. Po porovnaní sekvencií boli nájdené 4 nekomplementárne bázy, pričom jedna nekomplementárna báza sa nachádzala priamo v PAM sekvencii. Ďalšie skóre, ktoré bolo zohľadnené pri výbere sgRNA bola aktivita podľa Doench [8], ktorá nám hovorí o schopnosti endonukleázy Cas9 vytvoriť zlom na danom mieste v sekvencii. Vo vybranej sgRNA hodnota aktivity bola vypočítaná na 0,619.

Zlom nastane na C-terminálnom konci presne pred stop kodónom, za ktorým sa nachádza PAM sekvencia (GGG). Následne je tento zlom opravovaný bunkou pomocou homologickej rekombinácie (HR), ktorá používa na opravu ssODN templát. Ten nasadá ľavým homologickým ramienkom, ktoré je dlhé 60 bp na oblasť posledného 86 exónu, a pravým homologickým ramienkom dlhým taktiež 60 bp na oblasť za stop kodón (3´UTR oblasť). Uprostred ramienok sa nachádza vložený inzert 2x HA-tag, ktorý si bunka pri oprave syntetizuje.

Detekčné primery (Tab. 3) na identifikáciu mutantov *E. gracilis* vzniknutých po ovplyvnení genómu pomocou CRISPR-Cas9 sme navrhli v blízkosti C-terminálneho konca. Celkovo boli navrhnuté 3 primery. Priamy primer (*forward*) s označením BGL_Crispr_F sa nachádza pred vkladaným inzertom. Spätný (*reverse*) primer BGL_Crispr_Insert_R sa nachádza priamo v inzerte a slúži na potvrdenie transformácie génu – inzert bol úspešne vpravený do sekvencie. Druhý spätný (reverse) priemer, bol navrhnutý za inzertom v 3´UTR oblasti. Rozdielna dĺžka produktov primerov BGL_Crispr_F a BGL_Crispr_R slúži na potvrdenie úspešnosti transformácie. Mutant vzniknutý transformáciou bude mať dĺžku produktu 655 nt zatiaľ čo produkt z bunky kde neprebehla transformácia bude mať len 611 nt.

Tabuľka 3: Charakteristika primerov

Názov	Sekvencia (5´- 3´)	Tm (°C)	%GC	Produkt (bp)
BGL_F1	CAAAACGCAGAAGCCAACGA	60	50	425
BGL_R1	AATCACTGTCAGCCATGGGG	60	55	
BGL_F2	GACGTTGACGACTTGTTCCG	59,5	55	377
BGL_R2	ATTACGTCCCAGACCAGCAG	59,5	55	
BGL_Crispr_F	AACTGTCAGGGTCCCCATAC	58,7	55	
BGL_Crispr_Insert_R	TCGTAAGGGTAGCGGTCGTT	61	55	423
BGL_Crispr_R	AGCGAGACATGTGGCACGAT	62	55	665/611

(Tm– Temperature melting – teplota topenia, %GC – Percento guanínu a cytozínu)

Záver

Vzhľadom na všestrannosť *E. gracilis*, paramylon môže byť produkovaný buď vo fotoautotrofných alebo heterotrofných podmienkach a tvorí až 50-70% suchej hmotnosti bunky. Ukladá sa vo forme granúl viazaných na membránu v cytosóle a ľahko sa rozkladá, čím poskytuje zdroj uhlíka. V našej práci sme sa zamerali na štúdium funkcie génov kódujúcich paramylón – *β*-1,3-glukán syntázy. Vďaka bioinformatickej analýze v programe Genious Prime sme navrhli komonenty pre transformáciu buniek *E. gracilis. Knock-in* fragment obsahuje 2x HAtag, ktorý bude vnesený za pomoci ssODN na C-terminálny koniec sekvencie.

V ďalšej molekulárnej časti (*in vitro*) práce budeme za pomoci elektroporácie vnášať CRISPR-Cas9 komponenty navrhnuté v *in silico* analýze do buniek *E. gracilis* a následne analyzovať vzniknutých mutantov pomocou detekčných primerov.

Poďakovanie

Táto práca bola podporená z projektu VEGA - 1/0694/21Vplyv intra- a extracelulárnych faktorov na metabolizmus a motilitu euglenoidných bičíkovcov.

Použitá literatúra

[1] Tanaka, Yuji et al. 2017. Glucan synthase-like2 is indispensable for paramylon synthesis in Euglena gracilis. In FEBS Letters, vol. 591. no. 10, pp. 1360-1370, ISSN 0014-5793

[2] IEIRI, H., *et al.* 2021. Paramylon extracted from *Euglena gracilis* EOD-1 augmented the expression of SIRT1. In: *Cytotechnology*, roč.73, s. 755–759, ISSN 1573-0778

[3] Chen, Zhenfan et al., 2022. A Synthetic Biology Perspective on the Bioengineering Tools for an Industrial Microalga: Euglena gracilis. In Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, vol. 10, pp. 1564-1567 ISSN 22964185

[4] Ishikawa, Marumi et al., 2022. CRISPR/Cas9-mediated generation of non-motile mutants to improve the harvesting efficiency of mass-cultivated Euglena gracilis. In Plant biotechnology journal, vol. 20, no. 11 pp. 2042-2044 ISSN 1467-7652

[5] Nomura, Toshihisa., *et al.,* 2019. Highly efficient transgene-free targeted mutagenesis and single-stranded oligodeoxynucleotide-mediated precise knock-in in the industrial microalga Euglena gracilis using Cas9 ribonucleoproteins. In *Plant Biotechnology Journal* , vol. 17, no. 11, pp. 2031-2034, ISSN 14677652

[6] Cordoba J., *et al*. 2021 De Novo Transcriptome Meta-Assembly of the Mixotrophic Freshwater Microalga Euglena gracilis. In Genes, roč. 12, č. 6, s. 842-851ISSN 2073-4425

[7] Kešeľáková *et al.,* 2021, nepublikované dáta

[8] Doench, John et al. 2016. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. In Nature, vol. 34. pp.184-191, ISSN 1546-1696

[9] Zhang, Feng et al. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. In Nature, vol. 8, pp.2281-2308, ISSN 1750-2799

Vplyv vybraných suplementov FLI média (FGF2, LIF, IGF1) na *in vitro* maturáciu oocytov

Effect of selected supplements of FLI medium (FGF2, LIF, IGF1) on *in vitro* maturation of oocytes

Patrik Fecko[1]
Školiteľ: Alexandra Rosenbaum Bartková[2]
[1]Katedra Zoológie a antropológie, FPVaI UKF, Nábrežie mládeže 91, 949 01 Nitra,
[2]Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, Rumburská 89, 277 21 Liběchov, Česká republika
[1] patrik.fecko@student.ukf.sk, [2]arbartkova@ukf.sk

Abstrakt
In vitro maturácia (IVM) je perspektívna metóda v oblasti asistovanej reprodukcie, umožňujúca dozrievanie oocytov mimo prirodzeného prostredia vaječníkov. Táto technika rozširuje dostupnosť asistovanej reprodukcie, zohrávajúc kľúčovú úlohu v liečbe a výskume neplodnosti. Avšak jej využitie je sprevádzané komplikáciami spojenými s replikáciou komplexného *in vivo* prostredia a dosiahnutím meiotickej zrelosti. Úspešnosť IVM sa zvyšuje viacerými faktormi a jedným z nich je aj výber špecifického maturačného média. Rastové faktory a cytokíny, ako fibroblastový rastový faktor 2 (FGF2), inzulínu podobný rastový faktor 1 (IGF1) a leukemický inhibičný faktor (LIF), prídavné zložky FLI média, sa ukázali ako účinné pri zlepšovaní maturácie oocytov a kvality embryí. Nami získané dáta potvrdzujú, že tieto komponenty a rovnako aj FLI médium výrazne zlepšuje úspešnosť dozrievania prasacích oocytov *in vitro*, poukazujúc na ich potenciál pri IVM technikách.

Kľúčové slová: oocyt, FLI médium, IVM, rastové faktory

Abstract
In vitro maturation (IVM) is a promising method in the field of assisted reproduction, allowing the maturation of oocytes outside the natural environment of the ovaries. This technique expands the availability of assisted reproduction, playing a crucial role in the treatment and research of infertility. However, its utilization is accompanied by complications associated with replicating the complex *in vivo* environment and achieving meiotic maturity. The success of IVM is influenced by various factors, and one of them is the selection of a specific maturation medium. Growth factors and cytokines, such as fibroblast growth factor 2 (FGF2), insulin-like growth factor 1 (IGF1), and leukemia inhibitory factor (LIF), additional components of the FLI medium, have been proven effective in improving the maturation of oocytes and embryo quality. Our obtained data confirm that these components, along with the FLI medium, significantly enhance the success of *in vitro* maturation of porcine oocytes, highlighting their potential in IVM techniques.
Key Words: oocyte, FLI medium, IVM, growth factors

Úvod

Pokrok v technikách dozrievania a oplodnenia cicavčích oocytov *in vitro* (IVF) umožnil vývoj úspešných metód asistovanej reprodukcie aplikovateľnej nie len v humánnej medicíne, ale aj v biotechnológiách živočíchov. Aj napriek pokroku, však stále existuje potreba ďalšieho výskumu na úplné pochopenie všetkých aspektov biológie oocytov, čím by sa maximalizoval potenciál jej využitia v programoch, ako je IVF a iné reprodukčné biotechnológie.

Jednou dôležitou oblasťou vyžadujúcou ďalšie skúmanie sú mechanizmy, ktoré regulujú konečné dozrievanie oocytov, vrátane ich uvoľňovania z prirodzeného bloku počas meiotickej profázy a ich progresie až do metafázy II (MII). *In vivo* je dozrievanie oocytov stimulované návalom luteinizačného hormónu (LH) pred ovuláciou. LH sa viaže na receptory na nástenných granulóznych bunkách, čo vedie k produkcii špecifických peptidov podobných epidermálnemu rastovému faktoru, ktoré prenášajú signály do buniek kumulu a samotného oocytu. Interakcia medzi týmito folikulárnymi bunkami vedie k obnoveniu meiózy v oocytoch, expanzii buniek kumulu a ovulácii zrelých kumulus-oocytárnych komplexov (COCs) [1,2,3].

V *in vitro* prostredí je dosiahnutie MII fázy závislé od procesu nazývanom *in vitro* maturácia (IVM). IVM predstavuje proces v technológiách asistovanej

reprodukcie, ktorý ponúka alternatívu pre dozrievanie oocytov mimo prirodzeného prostredia vaječníkov. Táto metóda je obzvlášť cenná pre svoj potenciál rozšíriť dostupnosť asistovanej reprodukcie, čo z nej robí kľúčovú cestu pre liečbu a výskum neplodnosti [4, 5].

Replikácia komplexného *in vivo* prostredia, zložitosť meiotického procesu a signalizácia medzi oocytom, bunkami kumulu a okolitým mikroprostredím predstavujú prekážky, ktoré znižujú úspešnosť a využitie celkového potenciálu tejto techniky. Práve z tohto dôvodu je primárnym cieľom aktuálnych embryotechnologických výskumov zefektívnenie a optimalizácia *in vitro* maturačných systémov.

Jedným z účinných prístupov je optimalizácia a doplnenie kultivačných médií rôznymi suplementami (rastové faktory, cytokíny, antioxidanty a pod.), ktoré sú prirodzene prítomné pri maturácii *in vivo* [6]. Výsledkom takejto optimalizácie je aj nové maturačné médium FLI. V našich laboratórnych podmienkach sme prvotnými dátami potvrdili celkový pozitívny vplyv FLI na IVM a celkovú produkciu embryí *in vitro*. Avšak nezamerali sme sa na vplyv jeho jednotlivých zložiek. Preto je cieľom tohto článku analýza vplyvu prídavných nadštandardných suplementov, fibroblastového rastového faktora 2 (FGF2), inzulínu podobného faktora 1 (IGF1) a leukemického inhibičného faktora (LIF) na úspešnosť *in vitro* maturácie oocytov ošípanej.

1. Maturačné médiá

Maturačné médiá oocytov sú navrhnuté tak, aby napodobňovali prirodzené prostredie oocytov v rámci samičieho reprodukčného systému. Skladajú sa z rôznych zložiek, ktoré podporujú rast a dozrievanie oocytov. Základné médium zvyčajne obsahuje základné živiny, aminokyseliny, vitamíny a minerály. Okrem toho sú tieto médiá doplnené o hormóny, ako je folikuly stimulujúci hormón (FSH) a luteinizačný hormón (LH) na stimuláciu dozrievania oocytov. Na znižovanie oxidačného poškodenia sa využívajú antioxidanty, napríklad vitamíny C, E, astaxantín. Ďalej sa používajú séra ako ľudský sérový albumín (HSA) a fetálne ťeľacie sérum (FCS), ktoré podporujú expanziu kumulárnych buniek a jadrové dozrievanie. Potrebné je aj doplnenie živín ako zdroja energie, pričom najčastejšie sa pridáva glukóza, pyruvát ale aj aminokyseliny či rôzne minerály a ióny [7,8].

Zahrnutie špecifických rastových faktorov a cytokínov do maturačných médií preukázalo účinnosť pri zvyšovaní rýchlosti dozrievania a vývinovej kompetencie u rôznych druhov cicavcov, vrátane ľudí [6].

1.1 Rastové faktory a cytokíny v IVM

Optimalizácia maturačnných médií, ktorých zloženie napodobňuje *in vivo* prostredie prirodzene tvorené bunkami kumulu a granulózy počas vývinu folikulov, je jednou z účinných metód zlepšenia *in vitro* maturácie. Pridanie špecifických rastových faktorov a cytokínov do maturačného média môže viesť k zlepšeniu kvality oocytov, zvýšeniu miery oplodnenia a zlepšenému vývinu embryí [7,8].

Rastové faktory predstavujú jednu z kľúčových látok pre zlepšenie maturačného médiá pri IVM. FLI médium, kombinujúce FGF2, IGF1 a LIF, predstavuje inovatívny prístup. Tieto faktory zlepšujú dozrievanie oocytov a zvyšujú kvalitu embryí [9].

FGF2 stimuluje proliferáciu buniek a podporuje dozrievanie oocytov. Vo FLI médiu prispieva k zvýšenému jadrovému dozrievaniu oocytov, zlepšenej kvalite extracelulárnej matrix a inhibícii apoptózy granulóznych buniek. Taktiež má vplyv na procesy brázdenia a vývinu blastocyst [10,11].

IGF1 je dôležitý pre expanziu buniek kumulu v reakcii na FSH. Podporuje syntézu a zadržiavanie kyseliny hyalurónovej v COCs, čím ovplyvňuje interakcie medzi týmito bunkami. Taktiež prispieva k jadrovému dozrievaniu oocytov.

Obohatenie o LIF má pozitívny efekt na dokončenie jadrového dozrievania a vývin blastocyst v prasacích a hovädzích oocytoch. LIF je rovnako potencionálnym regulátorom expresie miRNA v oocytoch a kumulárnych bunkách a taktiež vplýva na génovú expresiu v embryách [9,11,12].

2 Materiál a metodika

Všetky chemikálie boli zakúpené od Sigma-Aldrich (Mníchov, Nemecko), pokiaľ nie je uvedené inak. Všetky plastové materiály boli zakúpené od Nunc (Roskilde, Dánsko). Použité média boli filtrované a vyhriaté na teplotu 38.5°C.

2.1 Izolácia oocytov

Vaječníky prasničiek boli získané z miestneho bitúnku a transportované v termoboxe pri teplote 38°C. Obsah antrálnych folikulov (3–6 mm) sa odsal pomocou aspirácie a sedimentoval počas 10 minút. Po dvoch premytiach v PXM-Hepes boli COCs vyizolované zo sedimentu pomocou ústnej kapiláry. V rámci splnenia praktickej časti boli využité iba kvalitné COCs

s homogénnou ooplazmou a kompaktným viacvrstvovým kumulom.

2.2 *In vitro* maturácia oocytov

Izolované COCs boli premyté v médiu TCM 199 a následne rozdelené do piatich experimentálnych skupín podľa typu maturačného média, konkrétne:

- Kontrola (K): TCM 199+EGF+PMSG+hCG
- K+ FGF2
- K+ IGF1
- K+ LIF
- FLI

COCs boli maturované v skupinách po 30-35 a kultivované 44 hodín v 0,5 ml maturačného média pri 38,5 °C s 5 % CO_2.

Tab. 1: Zloženie TCM maturačného média

TCM 199 maturačné médium	
TCM 199 stock	2 ml
EGF	10 ng/ml
PMSG	10 IU/ml
hCG	10 IU/ml

Tab. 2: Zloženie FLI maturačného média

Zložky	FLI
TCM199	TCM199
Pyruvát sodný	0,2 mM
L-glutamím	6,85 mM
Cysteín	0,57 mM
Gentamycín	50 µg/mL
BSA	1 mg/mL
PMSG	10 IU/mL
hCG	10 IU/mL
EGF	10 IU/mL
ľudský LIF	2 µg/mL
ľudský IGF1	20 ng/mL
ľudský FGF2	40 ng/mL

2.3 Hodnotenie maturácie oocytov

Po 44 h maturácie, boli odstránené kumulárne bunky z oocytov pomocou 100 µl pipety. Následne boli oocyty bez kumulárnych buniek opláchnuté v PXM-HEPES a fixované v roztoku kyseliny octovej a etanolu (1:3) počas 48 hodín. Potom sa oocyty skúmali pod svetelným mikroskopom po farbení 1% orceínom. Úspešnosť jadrového dozrievania bola stanovená na základe detekcie MII fázy, ktorá je charakterizovaná prítomnosťou pólového telieska a chromozómov uložených v metafázovej platničke (Obr 1.).

3 Výsledky a diskusia

Pre štatistické vyhodnotenie daného experimentu sme využili dvojvýberový t-test s 5% chybou pre určenie signifikantnosti výsledkov.

3.1 *In vitro* maturácia oocytov

Jedným z kľúčových aspektov *in vitro* produkcie embryí je dosiahnutie vývinovej kompetencie oocytov.

V našej práci sme sa zamerali na vplyv zloženia maturačných médií, konkrétne na analýzu jednotlivých prídavných suplementov FLI maturačného média, ktoré podmieňuje jeho pozitívny efekt. Náš experiment pozostáva z porovnania TCM 199 kontrolného média (Tab. 1), FLI média (Tab. 2) a jeho extra prídavkov FGF2, IGF1 a LIF na úspešnosť dosiahnutia MII fázy v rámci *in vitro* maturácie oocytov. Daný experiment sme zopakovali trikrát a celkovo sme mali päť experimentálnych skupín.

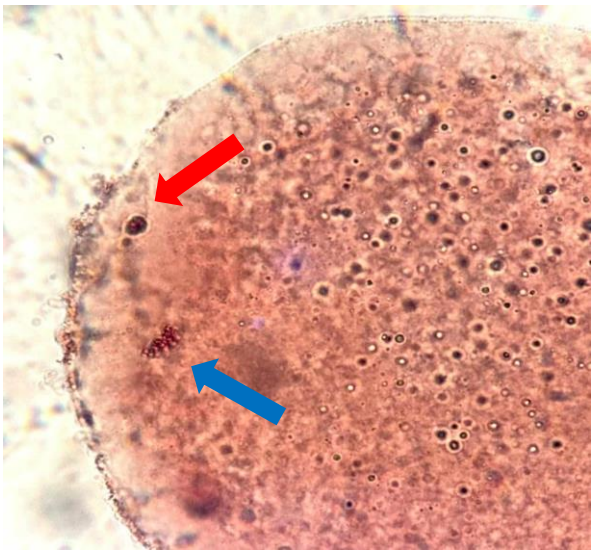
Tab. 3: Úspešnosť IVM oocytov

Médium	Počet oocytov	MII
K	110	73 (66,36% ±1,81)^{A}
K+FGF2	110	101 (91,81% ±1,23)^{B}
K+IGF1	110	102 (92,72% ±1,60)^{B}
K+LIF	110	106 (96,36% ±0,89)^{B}
FLI	110	108 (98,18% ±0,61)^{B}

V našich laboratórnych podmienkach sme sledovali dosiahnutie MII fázy v kontrolnom maturačnom médiu v 66,36% ±1,81. Výrazné zlepšenie IVM sa dosiahlo pridaním rastových faktorov/cytokínov. Pridanie FGF2 do kontrolného média zlepšilo maturáciu oocytov signifikantne. V tomto prípade sme MII fázu detegovali v 91,81% ±1,23. V prípade pridania IGF1 bola MII fáza detegovaná v 92,72% ±1,60. LIF dosiahlo ako

samostatný suplement najlepšie výsledky a to mierou úspešnosti maturácie, ktorá dosiahla 96,36% ±0,89. Kombinácia všetkých troch suplementov v podobe FLI maturačného média však bola najlepšia, pričom úspešnosť maturácie dosiahla 98,18% ±0,61 (Tab. 3).

Prezentované údaje potvrdili, že médium FLI podporuje maturáciu oocytov ošípanej v *in vitro* podmienkach. Našimi výsledkami sme jasne preukázali, že je to spôsobené pôsobením kombinácie troch pridaných suplementov – FGF2, LIF a IGF1, pričom pridanie LIF má najviac pozitívny vplyv na dosiahnutie MII fázy a signifikantne prispieva k optimalizácii bežne používaného média TCM 199, ktoré v našom prípade predstavovalo kontrolnú skupinu.



Obr 1. Oocyt v metafáze II
červená šípka označuje pólové teliesko; modrá šípka označuje chromozómy v MII
Zdroj: autor

Účinky každého jednotlivého cytokínu na IVM oocytov boli pomerne široko študované. Rôzne varianty FGF zlepšujú IVM oocytov hovädzieho dobytka a oviec [13,14,15].

LIF môže tiež zlepšiť IVM oocytov u niektorých živočíšnych druhov hlavne prostredníctvom svojej schopnosti aktivovať signálne dráhy mitogén-aktivovanej proteín kinázy (MAPK) [16,17].

Pozitívny účinok IGF1 popísal Javvaji *et al.* (2021) [18]. Cieľom ich štúdie bolo posúdiť účinok IGF1 počas *in vitro* dozrievania ovčích oocytov. Z výsledkov vyplýva, že suplementácia maturačného média o IGF1 významne ($p<0,05$) zlepšila rýchlosť a úspešnosť dosiahnutia MII fázy v porovnaní s kontrolou (81,5% ± 2,40 vs. 73,6% ± 0,94). Podobné výsledky dosiahol aj Yang *et al.* (2022) [19] v prípade maturácie bovinných oocytov. Počas IVM oocytov hovädzieho dobytka dokázali, že suplementácia média IGF1 stimuluje expanziu kumulu, oxidačný metabolizmus a jadrové dozrievanie, kde detegovali MII fázu v 84.02 ± 4.93%.

Záver

Získané dáta jasne potvrdzujú, že FLI médium zlepšuje dozrievanie prasacích oocytov *in vitro*. Čiastková analýza troch suplementov FGF2, LIF a IGF1 v médiu poukazuje na zlepšenie vývinu prasacích oocytov do porovnateľnej úrovne bez rozdielu na druh maturačného média. Z týchto suplementov sa preukázal ako najúčinnejší LIF. Miera úspešnosti v kontrolnom médiu bez rastových faktorov bola 66%, oproti 98% úspešnosti maturácie vo FLI médiu, čo poukazuje na dôležitosť optimalizácie maturačných médií. Začlenenie rastových faktorov a cytokínov ako doplnkov do maturačných médií predstavuje sľubnú stratégiu na zlepšenie dozrievania oocytov v postupoch IVF.

Poďakovanie

Týmto by som sa chcel poďakovať svojej školiteľke RNDr. Alexandre Rosenbaum Bartkovej, PhD., MBA za pomoc, čas, ochotu, usmernenia, ktoré mi poskytovala a za možnosť absolvovať stáž na UŽFG AV ČR v Liběchove.

Použitá literatúra

[1] YUAN, Ye - KRISHER, Rebecca L. *In Vitro* Maturation (IVM) of Porcine Oocytes. In CHAN, Wai-Yee a BLOMBERG, Le Ann (ed.) Germline Development: Methods in Molecular Biology. New York: NY: Springer New York, 2012, pp. 183-198. ISBN 978-1-61779-435-3.

[2] LONERGAN, Patrick - FAIR, Trudee 2016. Maturation of Oocytes *in Vitro*. In Annual Review of Animal Biosciences, vol. 4, no. 1, pp. 255-268. ISSN 2165-8102.

[3] GRUPEN, Christopher G. 2014. The evolution of porcine embryo in vitro production. In Theriogenology, vol. 81, no. 1, pp. 24-37. ISSN 0093691X.

[4] VUONG, Lan N. *et al.* 2019. The Place of *In Vitro* Maturation in Assisted Reproductive Technology. In Fertility & Reproduction, vol. 1, no. 1, pp. 11-15. ISSN 2661-3182.

[5] DAHAN, Michael H. *et al.* 2016. Clinical definition paper on *in vitro* maturation of human oocytes. In Human Reproduction, vol. 31, no. 7, pp. 1383-1386. ISSN 0268-1161.

[6] PROCHAZKA, Radek *et al.* 2017. Significance of epidermal growth factor receptor signaling for acquisition of meiotic and developmental competence in mammalian oocytes. In Biology of Reproduction, vol. 97, no. 4, pp. 537-549. ISSN 0006-3363.

[7] DE VOS, Michel *et al.* 2021. Perspectives on the development and future of oocyte IVM in clinical practice. In Journal of Assisted Reproduction and Genetics, vol. 38, no. 6, pp. 1265-1280. ISSN 1058-0468.

[8] WALLS, Melanie L. - HART, Roger J. 2018. In vitro maturation. In Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, vol. 53, pp. 60-72. ISSN 15216934.

[9] STOECKLEIN, Katy S. *et al.* 2021. Improved cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos using FGF2, LIF, and IGF1. In PLOS ONE, vol. 16, no. 2. ISSN 1932-6203.

10. BARROS, Rodrigo G. *et al.* 2019. Fibroblast growth factor 2 regulates cumulus differentiation under the control of the oocyte. In Journal of Assisted Reproduction and Genetics, vol. 36, no. 5, pp. 905-913. ISSN 1058-0468.

[11] SERRANO ALBAL, María *et al.* 2022. Supplementation of porcine *in vitro* maturation medium with FGF2, LIF, and IGF1 enhances cytoplasmic maturation in prepubertal gilts oocytes and improves embryo quality. In Zygote, vol. 30, no. 6, pp. 801-808. ISSN 0967-1994.

[12] TIAN, Hao *et al.* 2021. Enhancing the developmental competence of prepubertal lamb oocytes by supplementing the *in vitro* maturation medium with sericin and the fibroblast growth factor 2 - leukemia inhibitory factor - Insulin-like growth factor 1 combination. In Theriogenology, vol. 159, pp. 13-19. ISSN 0093691X.

[13] ZHANG, Kun *et al.* 2010. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence *in vitro*. In REPRODUCTION, vol. 140, no. 6, pp. 815-826. ISSN 1470-1626.

[14]. ZHANG, Kun - EALY, Alan D. *et al.* 2012. Supplementing fibroblast growth factor 2 during bovine oocyte *in vitro* maturation promotes subsequent embryonic development. In Open Journal of Animal Sciences, vol. 2, no. 2, pp. 119-126. ISSN 2161-7597.

[15] MONDAL, Sukanta *et al.* 2015. Effect of Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) and Insulin Transferrin Selenium (ITS) on *In Vitro* Maturation, Fertilization and Embryo Development in Sheep. In Brazilian Archives of Biology and Technology, vol. 58, no. 4, pp. 521-525. ISSN 1516-8913.

[16] DANG-NGUYEN, Thanh Quang *et al.* 2014. Leukemia inhibitory factor promotes porcine oocyte maturation and is accompanied by activation of signal transducer and activator of transcription 3. In Molecular Reproduction and Development, vol. 81, no. 3, pp. 230-239. ISSN 1040-452X.

[17] MO, Xianhong *et al.* Leukemia inhibitory factor enhances bovine oocyte maturation and early embryo development. In Molecular Reproduction and Development, vol. 81, no. 7, pp. 608-618. ISSN 1040-452X.

[18] JAVVAJI, Pradeep Krishna *et al.* 2021. IGF-1 treatment during *in vitro* maturation improves developmental potential of ovine oocytes through the regulation of PI3K/Akt and apoptosis signaling. In Animal Biotechnology, vol. 32, no. 6, pp. 798-805. ISSN 1049-5398

[19] YANG, Sha *et al.* 2022. Supplementation of EGF, IGF-1, and Connexin 37 in IVM Medium Significantly Improved the Maturation of Bovine Oocytes and Vitrification of Their IVF Blastocysts. In Genes, vol. 13, no. 5. ISSN 2073-4425.

Vplyv vitamínu D3 na viabilitu primárnej bunkovej kultúry osteoblastov u potkanov

Effect of vitamin D3 on viability of primary rat osteoblast cell culture

Monika Fulková[1]
Školiteľ: Vladimíra Mondočková[1],
[1]Katedra botaniky a genetiky, FPVaI UKF, Nábrežie mládeže 91, 949 01 Nitra
monika.fulkova@student.ukf.sk, vmondockova@ukf.sk

Abstrakt
Vitamín D a jeho aktívne metabolity zohrávajú dôležitú úlohu v kostnej homeostáze. Efekt vitamínu D na kostné bunky osteoblasty je komplexný, podieľajúci sa na proliferácii, apoptóze, regulácii, diferenciácii a mineralizácii buniek. Cieľom našej práce je analyzovať vplyv vitamínu D_3 (alfakalcidol) na viabilitu primárnej bunkovej kultúry osteoblastov u potkanov. Bunky osteoblastovej kultúry boli 72 hodín vystavené rôznym koncentráciám vitamínu D_3 – 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 500nM. Bunková viabilita bola hodnotená pomocou MTS testu. Rozdiely medzi analyzovanými skupinami a kontrolou boli determinované pomocou jednofaktorovej analýzy rozptylu (one-way ANOVA). Suplementácia rôznych koncentrácií vitamínu D_3 nepriniesla negatívne signifikantné zmeny vo viabilite buniek a to dokonca i vo vyšších koncentráciách. Uvedená skutočnosť naznačuje pozitívny efekt alfakalcidolu na životaschopnosť osteoblastov.
Kľúčové slová: osteoblasty, alfakalcidol, viabilita.

Abstract
Vitamin D and its active metabolites play an important role in bone homeostasis. The effect of vitamin D on the bone cells osteoblasts is complex, involved in cell proliferation, apoptosis, regulation, differentiation and mineralization of the cells. The aim of our work is to analyze the effect of vitamin D_3 (alfacalcidol) on the viability of primary rat osteoblast cell culture. Osteoblasts cell cultures were exposed to varying concentrations of vitamin D_3 – 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 500nM for 72 hours. The cell viability was assessed using the MTS test. The differences between the analyzed groups and the control were determined using one-way variance analysis (one-way ANOVA). Supplementation of various concentrations of vitamin D_3 did not produce negative significant changes in cell viability, even in higher concentrations. This suggests a positive effect of alfacalcidol on osteoblast viability.
Key Words: osteoblasts, alfacalcidol, viability.

Úvod
Vitamín D je steroidný hormón, ktorého hlavnou úlohou je udržiavanie homeostázy vápnika a fosfátov a prostredníctvom toho sa podieľa na regulácií homeostázy kostí. Jeho účinok na organizmus je komplexný a podieľa sa na rôznych fyziologických procesoch zahrňujúcich reakcie oporného, imunitného a nervového systému. Disponuje tiež účinkom pri xenobiotickej detoxikácií, redukcii oxidačného stresu, neuroprotektívnymi funkciami, antimikrobiálnou obranou, protizápalovými a protirakovinovými účinkami a rôznymi kardiovaskulárnymi benefitmi. Vitamín D sa vyskytuje v dvoch formách: vitamín D_2 (ergokalciferol) a vitamín D_3 (cholekalciferol). Vitamín D_2 sa získava z potravy a jeho zdrojom sú najmä rastliny a huby. Hlavným zdrojom vitamínu D_3 je biosyntéza v pokožke zo 7-dehydrocholesterolu prostredníctvom fotoaktívnej reakcie vplyvom UV žiarenia. Po jeho vzniku sa viaže na vitamín D viažuci proteín (VDBP) a je transportovaný do pečene, kde vzniká 25-hydroxyvitamín D (kalcidiol) a následne do obličiek, kde vzniká jeho aktívna forma 1,25-dihydroxyvitamín D (kalcitriol). Vznik rôznych metabolitov ako aj procesy katabolizmu sú riadené enzýmovo. Kľúčovú úlohu účinku vitamínu D v tele hrajú receptory vitamínu D, ktoré sú prítomné vo všetkých tkanivách, čo podporuje jeho širokospektrálny účinok. Gén pre VDR sa nachádza na 12. chromozóme. Tieto receptory patria medzi transkripčné faktory a sú dôležité pri signalizácii 1, 25-dihydroxyvitamínu D. Na jeho regulácií sa podieľajú rôzne faktory, ako napríklad hladiny vápnika a fosforu, parathormón, genetické faktory a ich primárnou úlohou je zabrániť hypo/hyperkalcémii. Alfakalcidol (1α-hydroxy cholekalciferol) predstavuje syntetický analóg vitamínu D_3. Rozdiel medzi prírodným vitamínom D_3 a alfakalcidolom je v štruktúre a v spôsobe aktivácie. Jedná sa o prekurzor 1,25-dihydroxyvitamínu D_3 a je hydroxylovaný v pečeni a čiastočne v osteoblastoch na svoju aktívnu formu.

Jeho biologické vlastnosti ho robia zaujímavými hlavne z dôvodu liečby osteoporózy [1,2,3,4].

Kostné tkanivo predstavuje dynamický systém tvorený anorganickými aj organickými zložkami. Organická časť je tvorená bunkami kostného tkaniva a kolagénom. Rozoznávame štyri typy kostných buniek: osteocyty, osteoblasty, osteoklasty a bunky kostnej výstelky. Osteoblasty sú lokalizované pozdĺž povrchu kostí a vyznačujú sa svojou schopnosťou produkovať kostnú matrix. Tieto bunky tvoria približne 4-6% celkové množstva kostných buniek. Toto množstvo sa líši v závislosti od veku, typu kosti a hormonálnych zmien. V procese osteogenézy a vo fáze rastu kosti je osteoblastov viac. Osteoblasty pochádzajú z mezenchymálnych kmeňových buniek, z ktorých najskôr vznikajú osteoprogenitorové bunky so schopnosťou sa diferencovať na osteoblasty. Majú výraznú syntetickú aktivitu, produkujú množstvo osteogénnych proteínov a ukladajú kostnú matrix. Ich cytoplazma tvorí výbežky, prostredníctvom ktorých sú spojení s ostatnými osteoblastami. Cez cytoplazmatické výbežky prebieha aj výmena látok v kosti. Neskôr postupne dochádza k obklopovaniu kostnou hmotou a vznikajú z nich osteocyty [5,6,7,8].

Je všeobecne známe, že kostné tkanivo je hormonálne aktívny systém, ktorý je do značnej miery regulovaný endokrinnými zásahmi organizmu. Jeden z hlavných hormónov regulujúcich kostné tkanivo je vitamín D. Počas formovania kostí, osteoblasty podstupujú niekoľko štádií, ktorých signalizačné dráhy sú aktivované receptorom VDR. Vitamín D vplýva aj na proliferáciu alebo apoptózu osteoblastov, reguluje ich diferenciáciu na bunky produkujúce kostnú matrix a kontroluje následnú mineralizáciu kostnej hmoty. Štádium diferenciácie a mineralizácie osteoblastov je dôležité z hľadiska účinku vitamínu D na génovú transkripciu a bunkovú odpoveď. Osteoblasty obsahujú kompletný mechanizmus enzymatického metabolizmu a katabolizmu 1α,25-dihydroxyvitamínu D, aby si zabezpečili priamy lokálny efekt. To naznačuje, že vitamín D nepôsobí len ako endokrinný regulátor, ale aj ako autokrinný/parakrinný regulátor osteoblastov a kostnej formácie [9,10].

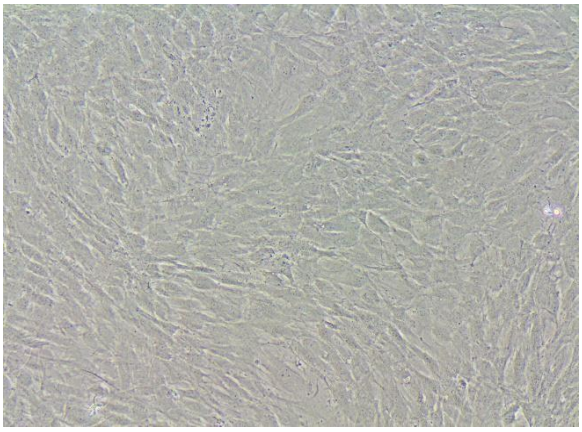
Cieľom našej práce je sledovanie vplyvu vitamínu D_3(alfakalcidolu) na viabilitu, čiže životaschopnosť primárnej bunkovej kultúry osteoblastov u potkanov.

1. Materiál a metódy

V tejto kapitole si bližšie popíšeme bunkové kultúry, ktoré existujú a ktoré použijeme vo výskume. Rovnako si opíšeme aj použité metódy pri spracovávaní výsledkov.

1.1 Bunková kultúra

Bunky primárnej kultúry osteoblastov z potkana boli získané od Innoprot (Derio, Španielsko). Bunky boli kultivované (obr.1) v rastovom médiu obsahujúcom alphaMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) s 10 % fetálnym bovinným sérom (FBS; Sigma-Aldrich) a antibiotikami (1 % roztok penicilínu a streptomycínu; HyClone, Logan , UT, USA). Samotná kultivácia prebiehala v kultivačných nádobách s objemom 75 cm^2v CO^2 inkubátore pre teplote 37 °C s 5 % $C0^2$ až do konfluencie na subkultiváciu. Kultivačné médiá boli menené každé 2 až 3 dni. Po dosiahnutí 80-90 % konfluencie boli bunky subkultivované podľa protokolu Taylor et al. 2014. [11] Experimenty sa uskutočnili počas fázy exponenciálneho rastu po 3. pasáži.



Obr. 1 Primárna bunková kultúra osteoblastov u potkanov.

1.2 Aplikácia vitamínu D

Bunky boli ošetrené rôznymi koncentráciami vitamínov D3 – 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 500nM (Alfacalcidol; Selleck Chemicals, Houston, TX, USA). Zásobný roztoky vitamínu D3 bol pripravený v roztoku s DMSO o koncentrácii 12,48 mM. Pre získanie požadovanej koncentrácie bol zásobný roztok následne nariedený rastovým médiom alpha-MEM. Kontrolná skupina buniek bola ponechaná bez prídavku vitamínu D_3.

1.3 MTS test

Viabilita, čiže životaschopnosť buniek, bola hodnotená pomocou kitu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS, Promega). Bunky boli nasadené na 96-jamkovú doštičku v hustote 10 000buniek/jamka. Médium s vitamínom D3 v požadovanej koncentrácii bolo menené raz za 24 hodín. Expozícia vitamínom trvala 72 hodín. Po 72 hodinách bol uskutočnený samotný test viability, ktorý

prebiehal napipetovaním 20 µl reagentu do každej jamky s obsahom vzoriek kultivovaných v 100 µl kultivačného média s/bez prídavkami a následnej inkubácii platničiek v podmienkach 37°C, 5% CO^2. Po 2 hodinách sme spektrofotometricky merali absorbanciu pri vlnovej dĺžke 490 nm. Viabilitu buniek v jednotlivých vzorkách sme stanovili ako pomer optickej hustoty (OD) ku kontrole, pričom viabilitu kontrolnej skupiny sme považovali za 100%. (Biotek Epoch Microplate Reader, Santa Clara, CA, USA).

1.4 Štatistická analýza

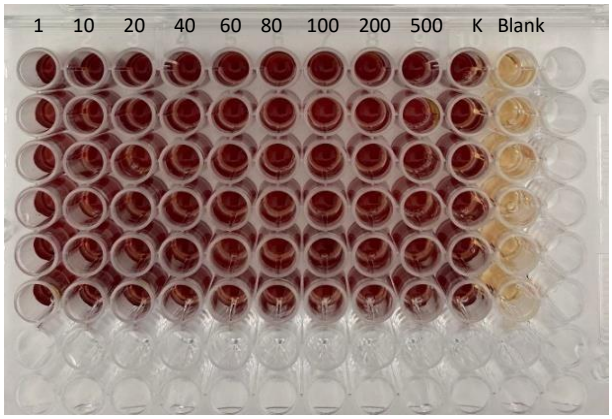
Štatistická analýza sa uskutočnila pomocou softvéru SPSS 26.0. (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA). Rozdiely v hodnotách medzi všetkými analyzovanými skupinami boli determinované pomocou analýzy variácií (One Way ANOVA) a post hoc testov (Tukeyho a Games-Howellov test). Rozdiely stanovené na hladine významnosti α=0,05 sme považovali za štatisticky významné.

2 Výsledky a diskusia

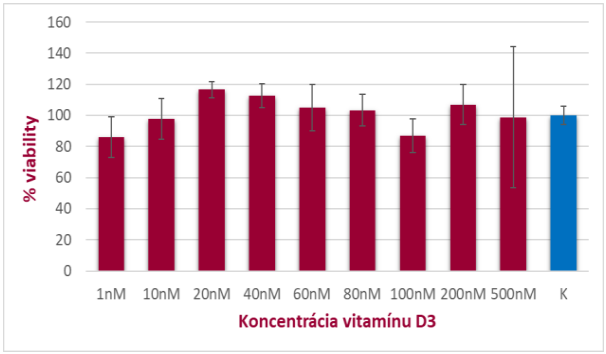
Viabilita primárnej bunkovej kultúry potkaních osteoblastov po liečbe rôznych koncentrácií vitamínu D_3 (alfakalcidol, 1-hydroxycholecalciferol), bola stanovená pomocou MTS testu. Test je založený na redukcii tetrazóliovej zlúčeniny životaschopnými bunkami za vzniku farebnej zmeny indukovanej formazánom. Suplementácia rôznych koncentrácií vitamínu D_3 (1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 500 nM) však nepriniesla negatívne signifikantné zmeny vo viabilite buniek a to dokonca i vo vyšších koncentráciách. Uvedená skutočnosť naznačuje pozitívny efekt alfakalcidolu na životaschopnosť osteoblastov.

Výsledky MTS testu sú zobrazené na obrázku 2. Efekt rôznych koncentrácií vitamínu D_3 je sumarizovaný v grafe 1.

Účinkom vitamínu D_3 na viabilitu osteoblastov alebo osteocytov sa zaoberali rôzne štúdie. Al Saedi et al. [12] skúmali vplyv 1,25-dihydroxyvitamínu D_3 na lipotoxicitu primárnych osteoblastov u starších ľudí. Osteoblasty boli ošetrené 250 µM kyselinou palmitovou (PA) a 10^{-8}M 1,25-dihydroxyvitamínom D_3 samostatne alebo v kombinácii pričom bola analyzovaná schopnosť proliferácie, diferenciácie a viability. V osteoblastoch ošetrenými PA a $1,25(OH)_2D_3$ bola zaznamenaná zvýšená schopnosť mineralizácie a diferenciácie a zvýšená bola aj celková viabilita osteoblastov v porovnaní s primárnou kultúrou ošetrenou iba PA. $1,25(OH)_2D_3$ bez ohľadu na PA zvýšil expresiu kľúčových signálny osteogénnych proteínov, konkrétne SMAD1-3,5, Runx2 a β-catenínu. Zmiernil aj vysokú úroveň zhoršenej autofágie vyvolanej PA.



Obrázok 2: Výsledky po MTS teste.



Graf 1: Vplyv jednotlivých koncentrácií vitamínu D_3 na viabilitu osteoblastov vyjadrenú v percentách.

Bu et al. [13] skúmali funkcie eldekalcitolu na funkciu diferenciácie a schopnosť viability osteoblastov počas prítomnosti a absencie osteoklastickej resorpcie. Eldekalcitol (ELD) je aktívny analóg vitamínu D_3, ktorý disponuje antiresorpčnými vlastnosťami a využíva sa ako terapetický liek pri liečbe osteoporózy v Japonsku. V ich štúdií bol pozorovaný účinok supernatantu kostnej resorpcie na základe regulácie viability, diferenciácie a iných parametrov prostredníctvom ELD na pre-osteoblastových bunkových kultúrach u myší. Pre-osteoblastové bunky boli ošetrené s ELD v kombinácií s diferencovanými kultúrami osteoklastov (OCS) alebo so supernatantovým osteoblastovým modelom kostnej resorpcie (BSR). Ošetrenie buniek s OCS a s OCS+ELD značne zvýšilo viabilitu buniek v porovnaní s kontrolnou skupinou, zatiaľ čo BSR + ELD značne znížila viabilitu buniek. Tieto zistenia naznačili,

že ELD počas in vitro experimentov znižuje schopnosť bunkovej diferenciácie. Diferenciácia bola meraná na základe prítomnosti ALP, čo je marker diferenciácie skorého štádia osteoblastov. Rolvien et al. [14] sa vo svojej štúdií venovali schopnosti vitamínu D_3 regulovať viabilitu osteocytov a perilakunárnu remodeláciu u ľudí a myší s deficitom vitamínu D_3. Kosti pacientov s deficitom vitamínu D prejavovali znížený počet životaschopných osteocytov, zvýšenie apoptózy a zhoršenú konektivitu. Množstvo osteocytov bolo takisto znížené u myší v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Nie je však jasné, či vitamín D reguluje počet osteocytov, ich konektivitu alebo veľkosť v prostredí zmenenej formácie kostí alebo v prostredí zhoršenej mineralizácie.

V našej práci sa nedokázalo, že by vysoké dávky alfakalcidolu spôsobili signifikantne zníženú viabilitu primárnej kultúry osteoblastov u potkanov. Tomoki et al. [15] sa zaoberali toxickými účinkami vplyvu 1,25 dihydroxyvitamínu D_3 na kosť pri sledovaní kostnej resorpcie v rámci in vivo experimentu s myšami. Experiment bol vykonaný na identifikáciu optimálneho trvania podávania $1,25(OH)_2D_3$ potrebného k indukcii toxickej hyperkalcémie. $1,25(OH)_2D_3$ bol injekčne podávaný po dobu 4 dní v dávkach 1, 5, 10 a 20 µg/kg telesnej hmotnosti samcom aj samiciam. Podľa výsledkov, 1 myš z každej skupiny, ktorým bola podávaná dávka ≥5 µg/kg trpeli závažnou hyperfosfatémiou a hyperkalcémiou. Sérové hladiny FGF23-kľúčového hormónu pri homeostáze vápnika a fosforu boli drasticky zvýšené. Zvýšený bol aj marker kostnej resorpcie C-terminálny telopeptid kolagénu typu I. Tieto výsledky demonštrujú, že podávanie vysokých dávok $1,25(OH)_2D_3$ je toxické a stimuluje kostnú resorpciu, čo má za následok znížený počet osteoblastov a osteocytov v kostiach. Napriek tomu, že vitamín D podporuje funkciu osteoklastov a tým pádom aj kostnú resorpciu Herada et al. 2012. [16] zistili, že v in vitro štúdiách s potkanmi alfakalcidol a eldekalcidol potláča kostnú resorpciu a napomáha teda pri udržiavaní kostnej hmoty.

V súčasnosti sa mnohé štúdie zameriavajú na skúmanie vplyvu vitamínu D_3 na diferenciáciu a proliferáciu osteoblastov. Wang et al. [17] vo svojej práci skúmali vplyv 25-hydroxyvitamínu D_3 a 1,25-dihydroxycitamínu D_3 v rôznych koncentráciách na diferenciáciu a mineralizáciu osteoblastov. Ich zistenia poskytujú spoľahlivý dôkaz, že $25(OH)D_3$ a $1,25(OH)_2D_3$ v koncentrácií 200 nM/L značne podporujú proliferáciu osteoblastov a $25(OH)_2D_3$ v koncentrácií 100-200 nM/L indukuje skorú diferenciáciu a mineralizáciu osteoblastov. Mansel a Blackburn [18] sa zaoberali vplyvom 1,25-dihydroxycholekalciferolu v kombinácií s kyselinou lyzofosfatidovou (LPA) na rast, maturáciu a viabilitu osteoblastov, kde poskytli základ pre ďalšie potencionálne skúmanie, na základe ich predchádzajúcich výskumov, kedy zistili, že kalcitriol v spoluprácií s LPA podporujú tvorbu osteoblastov z kmeňových buniek. Kvôli tomu sa odporúča ďalšie skúmanie účinkov 1,25-dihydroxycholekalciferolu v kombinácií s LPA na rast, dozrievanie a celkovú viabilitu osteoblastov.

Jednotlivé štúdie potvrdzujú, že pri účinku vitamínu D_3 na viabilitu osteoblastov alebo osteocytov zohrávajú dôležitú úlohu koncentrácia požitej látky, ako aj typ aktívneho metabolitu alebo analógu vitamínu D_3 a kombinácia s inými účinnými látkami, ktoré podporujú alebo potláčajú účinok daného metabolitu/analógu. Množstvo štúdií realizovalo výskum vplyvu metabolitov vitamínu D3 na základe sledovania schopnosti proliferácie osteoblastov, maturácie, schopnosti podstupovať apoptózu, mineralizácie a anabolického alebo katabolického účinku pri kostnej resorpcii alebo schopnosti znižovať množstvo ROS, čo môžu byť smerodajné ukazovatele pri skúmaní viability osteoblastov alebo osteocytov.

Záver

Naša štúdia predstavuje predbežnú analýzu vplyvu vitamínu D_3 (alfakalcidolu) na primárnu bunkovú kultúru potkaních osteoblastov. Výsledky budú ďalej využité v ďalších molekulárno-biologických experimentoch, v ktorých sa bude hodnotiť efekt vitamínu D na zmeny v aktivite alkalickej fosfatázy, na zmeny génovej expresie, schopnosť mineralizácie či zmeny v koncentráciách osteogénnych proteínov.

Uvedené analýzy by mohli potencionálne prispieť ku využitiu poznatkov o mechanizme vplyvu alfakalcidolu na kostnú formáciu, čo môže byť následne využité pri liečbe rôznych kostných ochorení akým je napríklad osteoporóza alebo nádorové ochorenia kostí.

Poďakovanie

Moje poďakovanie patrí školiteľke práce doc. RNDr. Vladimíre Mondočkovej, PhD. za jej ochotu a cenné rady pri písaní. Tento výskum bol uskutočnený s podporou projektu Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky (KEGA 034UKF-4/2022).

Použitá literatúra

[1] Saponaro, F. et al. 2020. An update on vitamin D metabolism. In International journal of molecular sciences [online], vol. 21, no. 6573. ISSN: 1422-0067.

[2] Balachandar, R. et al. 2021. Relative efficacy of vitamin D_2 and vitamin D_3 in improving vitamin D status: systematic review and meta analysis. In Nutrients [online], vol. 13, no. 3328. ISSN: 2072-6643.

[3] Gil, A. et al. 2018. Vitamin D: clasic and novel action. In Annals of nutrition and metabolism [online], vol. 72, pp. 87-95. ISSN: 1421-9697.

[4] Ranuccio, N. – Caffarelli, C. 2018. Clinical cases in mineral and bone metabolism. In EBSCO [online], vol. 15, no. 2, p. 173. ISSN: 1724-8914

[5] Stankovičová, T. a kol. 2015. Anatómia a fyziológia: teoretické a praktické návody na cvičenia pre farmaceutov [online]. Bratislava. Vydavateľstvo Univerzity Komenského v Bratislave. ISBN 978-80-223-3944-5.

[6] Florencio-Silva, R. et al. 2015. Biology of bone tissue: Structure, function and factors that influence bone cells. In BioMed research international [online], vol. 2015. ISSN: 2314-6141.

[7] Mizogouchi, T. – Noriaki, O. 2021. The diverse origin of bone forming osteoblasts. In Journal of bone and mineral research [online], vol. 36, no. 8, pp. 1732-1747. ISSN: 1523-4681.

[8] Bikle, D.D. 2012. Vitamin D and bone. In Current Osteoporosis Report [online], vol. 10, 2012, pp. 151-159. ISSN: 1544-2241.

[9] Van Driel, M. – van Leewuen, J. P. T. M. 2023. Vitamin D and bone: a story of endocrinne and auto/parakrinne action in osteoblasts. In Nutrients [online], vol. 15, no. 3, pp. 480. ISSN: 2072-6643.

[10] Odkhuu, E. et al. 2020. Vitamin D regulation of osteoblasts differentiation. In Central asian journal of medical sciences [online], vol. 6, no. 3. ISSN: 2414-9772.

[11] Taylor. S. E. B. – Shah, M. – Orriss, I. R. 2014. Generation of rodent and human osteoblasts. In Bonekey reports [online], vol. 3, no. 585. ISSN: 2047-6396.

[12] Saedi, A. A. et al. 2020. 1,25 (OH)2D3 ameliorates palmitate -induced lipotoxicity in human primary osteoblasts to improve viability and function. In Bone [online], vol. 145. ISSN: 1873-2763.

[13] Bu, J. et al. 2019. Eldecalcitol effects on osteoblastic differentiation and function in presence or absence of osteoclastic bone resorption. In Experimental and terapeutical medicine [online], vol. 18. no. 3. pp. 2111- 2121. ISSN: 1792-1015

[14] Rolvien, T. et al. 2017. Vitamin D regulates osteocytes survival and perilacunar remodeling in human and murine bone. In Bone [online], vol. 103, pp. 78-87. ISSN: 1873-2763.

[15] Tomoki, M. et al. 2020. The vitamin D receptor in osteoblast – lineage cells is essential for the proresorptive activity od 1α,25 $(OH)_2D_3$ in vivo. In Endocrinology [online], vol. 161, no. 11. ISSN: 1945-7170.

[16] Herada, S. et al. 2012. Daily administration of eldecalcitol (ED-71), an active vitamin D analog, increases bone mineral density by suppressing RANKL expression in mouse trabecular bone. In Journal of bone and mineral research [online], vol. 27, no. 2. ISSN: 1523-4681.

[17] Wang, D. – Song, J. – Ma, H. 2018. An in vitro experimental insight into osteoblasts responses to vitamin D3 and its metabolites. In Pharmacology [online], vol. 101, no. 5-6. ISSN: 1423-0313.

[18] Mansel, J. P. – Blackburn, J. 2013. Lydophosphatidic acid, human osteoblast formation, maturation and the role of 1α,25 dihydroxyvitami D3 (calcitriol). In Biochimica et biophysica acta [online], vol. 1823. no. 1. pp. 8-105. ISSN: 0006-3002.

Příprava a charakterizace želé cukrovinek s přídavkem extraktu brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus*)

Preparation and characterization of jelly candies with the addition of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) extract

Pavlína Knapovská[1]
Školitel: Eva Vítová[1]
[1]Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno
Pavlina.Knapovska@vut.cz, vitova@fch.vut.cz

Abstrakt

Práce se zabývá aplikací plodů brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus*) a jejich extraktu do želé cukrovinek a následnou charakterizací těchto cukrovinek z hlediska těkavých látek, celkových fenolických látek a anthokyanů, antioxidační aktivity, a senzorické kvality.

Těkavé látky byly stanoveny pomocí headspace mikroextrakce na pevnou fázi ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí, pro stanovení ostatních parametrů byly použity standardní spektrofotometrické metody. Senzorická kvalita vzorků byla hodnocena pomocí grafických stupnic.

Ve vzorku s přídavkem 25 % hm. extraktu bylo nalezeno 45, ve vzorku s přídavkem 15 % hm. borůvek 40 těkavých látek; kvantitativně nejvýznamnější byly (E) hexadec-9-enol, linalool, furfural, 2-ethylhexanol a hexanal.

S přídavkem extraktu i borůvek došlo u cukrovinek k výraznému zvýšení antioxidační aktivity, celkového obsahu anthokyanů i fenolických látek, pozitivně byla hodnocena barva a chuť obohacených vzorků a zlepšila se tak i jejich celková přijatelnost.

Klíčová slova: cukrovinky, brusnice borůvka, aromatické látky, antioxidanty, senzorická analýza

Abstract

This work deals with the application of bilberry fruits (*Vaccinium myrtillus*) and their extract to jelly candies and the subsequent characterization of these candies in terms of volatile compounds, total phenolic compounds and anthocyanins, antioxidant activity and sensory quality.

The volatiles were determined by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometry, standard spectrophotometric methods were used for the determination of the other parameters. The sensory quality of the samples was evaluated using graphical scales.

Forty-five and 40 volatile compounds were found in the sample with 25 and 15 wt.% of extract and bilberries, respectively; the most quantitatively significant were (E)-9-hexadecen-1-ol, linalool, furfural, 2-ethylhexan-1-ol and hexan-1-al.

With the addition of both the extract and the bilberries, the candies showed a significant increase in antioxidant activity, total anthocyanin and phenolic content, and the colour and flavour of the enriched samples were positively evaluated, thus improving their overall acceptability.

Key Words: sweets, bilberry, aroma compounds, antioxidants, sensory analysis

Úvod

Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*), dále jen borůvka, je vytrvalý keř patřící do čeledi vřesovcovitých (*Ericaceae*) rodu brusnice (*Vaccinium*). Plody mají modrofialovou barvu a vynikají vyváženou sladkokyselou chutí a příjemným aromatem. Dozrávají v období od července do září, v závislosti na jejich geografické poloze a klimatu [1; 2].

Díky vysokému obsahu bioaktivních látek, jako jsou antioxidanty, anthokyany, fenolické látky, vitaminy a další, jsou jim přisuzovány mnohé léčivé účinky. Své uplatnění našly jako součást zdravé stravy a jsou využívány i v lidovém léčitelství, zejména při léčbě poruch zraku, hyperglykémie, diabetu, obezity a zánětlivých onemocnění [3].

Fenolické látky, rostlinné sekundární metabolity, působí jako obranné sloučeniny proti stresovým vlivům z prostředí. V borůvkách jsou nejvíce zastoupeny anthokyaniny a flavonolové glykosidy, zejména sloučeniny kvercetinu, kaempferolu a v menší míře myricetinu. Také obsahují fenolické kyseliny, jako deriváty kyseliny hydroxyskořicové (kyselina kávová

a chlorogenová) a katechiny [4]. Podle dostupné literatury se celkový obsah fenolů a polyfenolů v plodech borůvky pohybuje v rozmezí 147–1152 mg_{GAE} na 100 g čerstvých plodů [3 - 6].

Fenolické látky, flavonoidy, vitaminy a další látky poskytují borůvkám antioxidační aktivitu. Ta se pohybuje se v rozmezí 6090 – 10600 μmol_{TE} na 100 g čerstvých plodů stanovením metodou TEAC [6].

Anthokyany patří mezi nejrozsáhlejší skupinu rostlinných barviv a v borůvkách tvoří až 90 % obsahu fenolických látek. Poskytují jim charakteristickou modrofialovou barvu a nacházejí se jak ve slupce, tak i v dužině plodu. Jejich obsah se pohybuje v rozmezí 300–700 mg_{C3G} na 100 g čerstvých plodů [1; 3] v závislosti na úrovni zralosti, geografických a klimatických podmínkách [6]. Mezi nejzastoupenější anthokyanidiny borůvek patří kyanidin, delfidin, malvidin, petunidin a peonidin; vyskytující se ve formě glykosidů s D-glukózou, L-rhamnózou, D-galaktózou, D-xylózou a L-arabinózou [3].

Aromatický profil borůvek je silně ovlivněn místem původu, dostupná data tedy nejsou příliš konzistentní. Souhrnný článek Satera a kol. [7] uvádí 99–109 identifikovaných těkavých látek v plodech a 24–53 ve vylisované šťávě. Nejhojněji zastoupené sloučeniny patří do skupiny C6-struktur, tzv. ,,těkavých látek zelených listů“, monoterpenů a aldehydů, např. hexan-2-on, (E) hexen-2-al, ethyl-3-methyl-butanoát, eukalyptol, linalool a nonanal [8].

Želé cukrovinky jsou oblíbenou pochoutkou jak mezi dětmi, tak i dospělými. Cílem této práce bylo připravit cukrovinky, které budou nejen chutné, ale také bohaté na bioaktivní látky.

1 Materiál a metódy

V této části si popíšeme v jednotlivých podkapitolách použitý materiál a metody, které jsme využili při práci.

1.1 Použitý materiál

Hlavním použitým materiálem byly zmrazené plody brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus*) z Podkrkonošské oblasti, extrakt plodů borůvky a vzorky cukrovinek. Jako modelové vzorky cukrovinek byly vyrobeny: standardní (STD), s přídavkem extraktu (EXT) a s přídavkem rozmělněných borůvek (BOR).



Obr. 1 Modelové želé cukrovinky (zleva: STD, EXT)
Zdroj: Autor

1.2 Použité metody

Extrakt byl připraven macerací rozmělněných borůvek ve vodě o navážce 1000 g/l, při teplotě 50 °C, po dobu dvou hodin. Podmínky extrakce byly optimalizovány na základě stanovení celkového obsahu fenolických látek.

Cukrovinky byly vyrobeny standardním technologickým postupem pro výrobu želé cukrovinek, smícháním cukrosirupového roztoku s nabobtnalou želatinou (7,5 % hm.) při teplotě 65 °C. Po dosažení teploty 50 °C byla do směsi přidána kyselina citronová (2 % hm.) a hmota byla formována do silikonových forem. Na základě senzorické analýzy byl zvolen optimální přídavek extraktu 25 % hm. a borůvek 15 % hm.

Vzorky pro stanovení aromaticky aktivních látek (AAL) byly analyzovány v navážce 3 g, borůvky a cukrovinky rozmělněné a extrakt byl analyzován v nezměněné podobě. Pro spektrofotometrické stanovení byla použita lisovaná borůvková šťáva, extrakt a vzorky cukrovinek rozpuštěné ve 40% ethanolu.

Pro kvalitativní a semikvantitativní stanovení těkavých látek byla použita metoda headspace mikroextrakce na pevnou fázi ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HS-SPME-GC-MS). Pro další stanovení byly použity spektrofotometrické metody. Celkový obsah fenolických látek (TPC) byl stanoven Folin-Ciocalteuovou metodou, antioxidační aktivita metodou TEAC s použitím činidla ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthyazolin-6-sulfonová kyselina)) a obsah celkových anthokyanů (TAC) byl stanoven pH diferenciální metodou. Výsledky těchto stanovení jsou uváděny ve tvaru aritmetický průměr ± směrodatná odchylka ze tří měření (n = 3).

Vzorky cukrovinek byly rovněž hodnoceny senzorickou analýzou, a to jak v rámci optimalizace, tak i optimalizované vzorky. Panel hodnotitelů se skládal z 25 studentů FCH VUT (n = 25) a k hodnocení byly použity nestrukturované grafické stupnice. Hodnocena

byla příjemnost a intenzita barvy, vůně i chuti, profilový test vybraných chutí (sladká, kyselá, ovocná) a celková přijatelnost vzorků.

2 Výsledky a diskuze

V této části jsme si vyhodnotili všechny výsledky na základě stanoveného cíle.

2.1 Stanovení těkavých látek

Těkavé látky ve vzorcích byly stanoveny metodou HS-SPME-GC-MS a identifikovány srovnáním jejich hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou.

V borůvkách bylo identifikováno celkem 35 AAL, z toho 8 alkoholů, 7 esterů, 6 aldehydů, 4 terpenoidy, 3 karboxylové kyseliny, 2 ethery, 2 terpeny, 2 uhlovodíky a 1 keton. Nejvyšší zastoupení zaujímal ethyl-3-methyl-butanoát (48,3 %), dále pak (E) hex-2-enal (10,7 %), hexanal (6,3 %) a ethyl-2-methyl-butanoát (5,6 %). Tyto konkrétní látky dodávají borůvkám ovocné (po jablcích a borůvkách), květinové a zelené aroma.

V připraveném borůvkovém extraktu bylo identifikováno celkem 37 AAL, z toho 10 alkoholů, 6 terpenoidů, 4 aldehydy, 4 estery, 4 karboxylové kyseliny, 3 ethery, 3 terpeny, 2 ketony a 1 uhlovodík. Nejvyšší zastoupení zaujímal 2-ethylhexanol (13,9 %), linalool (10,9 %), ethyl-3-methyl-butanoát (10,1 %), dihydromyrcenol (8,7 %) a (Z) hex-3-enol (5,9 %). Tyto konkrétní látky dodávají extraktu sladké, květinové a ovocné (po jablcích a citrusech) aroma.

Ve vzorku standardní cukrovinky bylo podle očekávání identifikováno pouze 14 AAL, které zahrnovaly 5 aldehydů, 4 alkoholy, 2 karboxylové kyseliny, 1 ester, 1 ether a 1 terpenoid. Nejvyšší zastoupení zaujímal 2-propylpentanol (21,9 %), (E) hexadec-9-enol (21,31 %) a furfural (17,0 %).

Ve vzorku cukrovinky s přídavkem extraktu bylo identifikováno celkem 45 AAL, konkrétně 12 alkoholů, 8 esterů, 6 aldehydů, 5 karboxylových kyselin, 5 terpenoidů, 2 ketony, 2 ethery, 2 terpeny, 2 uhlovodíky a 1 heterocyklická sloučenina. Nejvyšší zastoupení zaujímal (E) hexadec-9-enol (15,7 %), linalool (14,2 %), furfural (10,9 %) a 2-ethylhexanol (10,0 %).

Ve vzorku cukrovinky s přídavkem borůvek bylo identifikováno celkem 40 AAL, konkrétně 8 alkoholů, 8 esterů, 6 aldehydů, 4 karboxylové kyseliny, 4 terpenoidy, 3 ethery, 2 ketony, 2 terpeny, 2 uhlovodíky a 1 heterocyklická sloučenina. Nejvyšší zastoupení zaujímal linalool (22,7 %), (E) hexadec-9-enol (16,1 %), 2-ethylhexanol (8,4 %), furfural (6,5 %) a hexanal (6,0 %).

Studie zabývající se obsahem a zastoupením AAL v plodech borůvky v České republice chybí. Srovnání se zahraničními studiemi je poněkud obtížnější, dokazují totiž, že obsah AAL se výrazně mění s geografickými a klimatickými podmínkami. Studie Rohloff a kol. [8] identifikovala v plodech borůvky z Norska 99 AAL. Z 35 identifikovaných AAL v našich vzorcích borůvek se 20 sloučenin shodovalo se studií Rohloff a kol. [8] a 15 jich bylo odlišných. Semikvantitativně stanovené shodné AAL zaujímaly 90,0 % plochy píků všech stanovených látek. Uvedená studie používala pro extrakci AAL z plodů borůvek roztok chloridu sodného, což je faktor, který mohl mít výrazný vliv na rozdílné výsledky.

Ve všech vzorcích cukrovinek bylo identifikováno celkem 52 AAL, z toho 13 látek se vyskytovalo ve všech vzorcích, konkrétně hexanal, ethyl-hexanoát, nonanal, furfural, benzaldehyd, linalool, kyselina valerová, fenethylalkohol, dodekanol, kyselina kaprylová, 2-fenoxyethanol, piperonal a (E) hexadec-9-enol. Studie Ismarti a kol. [9] potvrzuje přítomnost furfuralu a benzaldehydu ve standardu vepřové želatiny, obdobné té, která byla použita pro přípravu vzorků cukrovinek. Je možné se tedy domnívat, že přítomnost těchto látek je spojena s použitím želatiny.

2.2 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

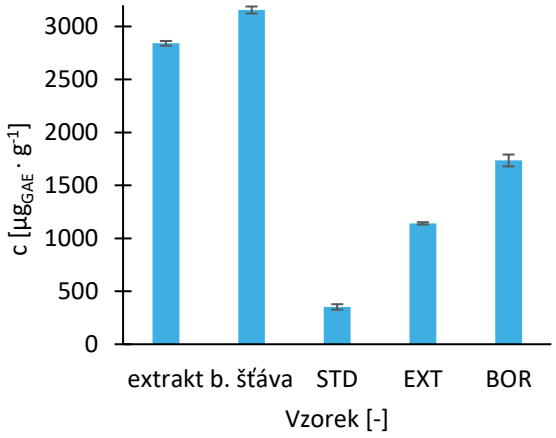
Nejvyšší obsah fenolických látek byl podle očekávání stanoven v borůvkové šťávě, konkrétně $3155 \pm 33\ \mu g_{GAE} \cdot g^{-1}$ a v extraktu $2841 \pm 22\ \mu g_{GAE} \cdot g^{-1}$ (viz graf 1).

Standardní cukrovinka obsahovala také jistý obsah fenolických látek, $352 \pm 26\ \mu g_{GAE} \cdot g^{-1}$, což mohlo být způsobeno citlivostí Folin-Ciocalteuova činidla. To není 100% citlivé pouze na fenolické látky, ale i na redukující látky, jako sacharidy a kyselinu citronovou, čímž mohlo dojít k navýšení zdánlivého obsahu fenolických látek v cukrovince.

Vzorek cukrovinky s přídavkem extraktu obsahoval $1141 \pm 11\ \mu g_{GAE} \cdot g^{-1}$ a s přídavkem borůvek $1735 \pm 56\ \mu g_{GAE} \cdot g^{-1}$ fenolických látek. U cukrovinek s přídavkem borůvek došlo k téměř pětinásobnému nárůstu obsahu fenolických látek oproti standardu, u cukrovinek s přídavkem extraktu je tento nárůst více jak trojnásobný.

Na celkový obsah fenolických látek v borůvkách mají výrazný vliv geografické a klimatické podmínky prostředí, ze kterého borůvky pochází. TPC borůvek ze

Slovinska stanovila studie Mikulcik-Petkovsek a kol. [4] v rozmezí 147 – 536 $mg_{GAE} \cdot 100\ g^{-1}$ čerstvých plodů (FW). Studie Colak a kol. [2] stanovila TPC v borůvkách z Turecka na 327 $mg_{GAE} \cdot 100\ g^{-1}$ FW a studie Vega a kol. [5] stanovila TPC v borůvkách ze Španělska na 342 $mg_{GAE} \cdot 100\ g^{-1}$ FW. Všechny tyto studie byly provedeny po extrakci fenolických látek z celých plodů. Přesto, že naměřená hodnota 315,5 $mg_{GAE} \cdot 100\ g^{-1}$ odpovídá jen TPC z lisované šťávy, je srovnatelná s výše uvedenými hodnotami z literatury [2; 4; 5]. Je možné předpokládat, že by TPC borůvek po extrakci bylo výrazně vyšší. Obsah bioaktivních látek je totiž soustředěn především ve slupce a těsně pod ní [1].



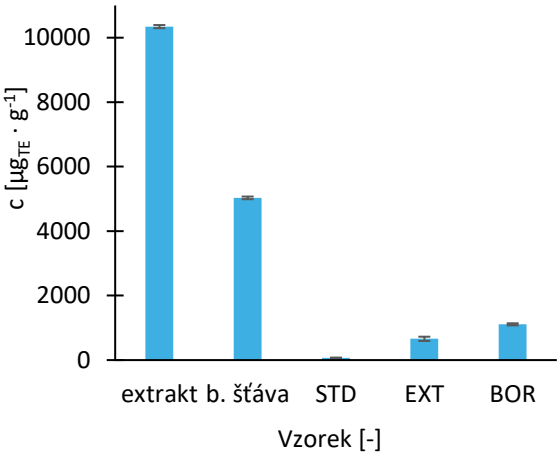
Graf 1. Obsah fenolických látek v hodnocených vzorcích

2.3 Stanovení antioxidační aktivity

Z grafu 2 je dobře patrné, že výrazně nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval připravený extrakt ($10343 \pm 48\ \mu g_{TE} \cdot g^{-1}$), cca dvojnásobnou antioxidační aktivitě borůvkové šťávy ($5031 \pm 42\ \mu g_{TE} \cdot g^{-1}$).

Dle předpokladů nejnižší antioxidační aktivitu vykazoval vzorek standardní cukrovinky, $68 \pm 10\ \mu g_{TE} \cdot g^{-1}$. Cukrovinky s přídavkem extraktu vykazovaly antioxidační aktivitu $660 \pm 66\ \mu g_{TE} \cdot g^{-1}$, tedy téměř desetinásobek aktivity standardu. Cukrovinky s přídavkem borůvek, s antioxidační aktivitou $1109 \pm 32\ \mu g_{TE} \cdot g^{-1}$, vykazovaly až šestnáctinásobnou aktivitu oproti standardu.

Antioxidační aktivita borůvek, z Norska a Finska, stanovená metodou s ABTS ve studii Urbonaviciene a kol. [6] se pohybovala v rozmezí 60,9 – 106,0 $\mu mol \cdot g^{-1}$, což odpovídá přibližně 15 262 – 26 564 $\mu g_{TE} \cdot g^{-1}$. Jedná se o výrazně vyšší hodnoty než byly stanoveny v našich vzorcích borůvkové šťávy i extraktu. Nižší hodnoty mohly být způsobeny, stejně jako u stanovení TPC, analýzou pouze lisované borůvkové šťávy, bez slupky, která může obsahovat významné množství látek s antioxidačním potenciálem.



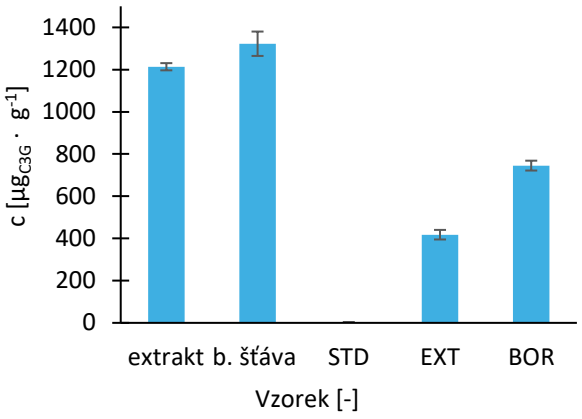
Graf 2. Antioxidační aktivita hodnocených vzorků

2.4 Stanovení celkového obsahu anthokyanů

Jak je vidět z grafu 3, obsah anthokyanů borůvkové šťávy ($1322 \pm 58\ \mu g_{C3G} \cdot g^{-1}$) a extraktu ($1214 \pm 17\ \mu g_{C3G} \cdot g^{-1}$) je téměř srovnatelný.

Dle předpokladu obsah anthokyanů ve vzorku standardní cukrovinky byl téměř zanedbatelný, $1,7 \pm 0,3\ \mu g_{C3G} \cdot g^{-1}$. V cukrovinkách s extraktem byl stanoven na $418 \pm 23\ \mu g_{C3G} \cdot g^{-1}$ a v cukrovinkách s borůvkami na $745 \pm 23\ \mu g_{C3G} \cdot g^{-1}$.

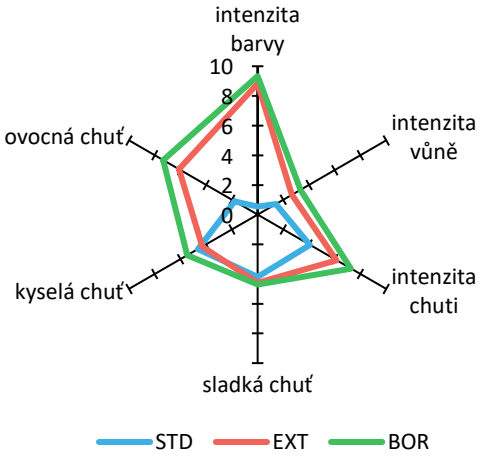
Celkovým obsahem anthokyanů v borůvkách se zabývala studie Benvenuti a kol. [3], která stanovila metodou HPLC obsah antokyanů borůvek z italských Alp na 582 – 759 $mg \cdot 100\ g^{-1}$ FW. Studie Urbonaviciene a kol. [6] stanovila TAC borůvek z Norska a Finska v rozmezí 233 – 476 $mg \cdot 100\ g^{-1}$ FW, rovněž pomocí metody HPLC. Hodnoty TAC analyzovaných vzorků borůvkové šťávy v této studii jsou poněkud nižší, což opět mohlo být způsobeno tím, že velká část anthokyanů je soustředěna ve slupce plodů.



Graf 3. Obsah anthokyanů v hodnocených vzorcích

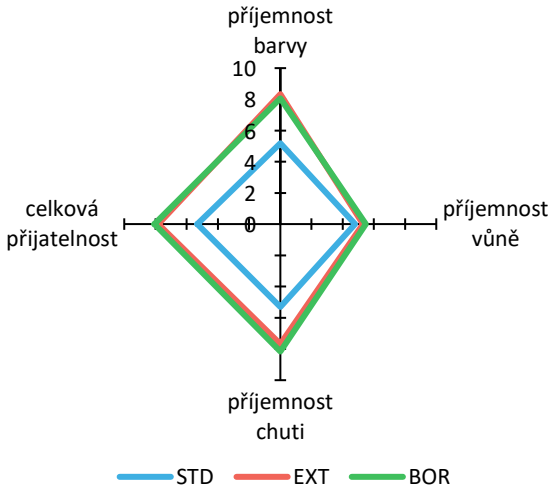
2.5 Senzorická analýza

Naším záměrem bylo samozřejmě vyrobit cukrovinky nejen nutričně hodnotné, ale především přijatelné ze senzorického hlediska, což bylo na závěr zhodnoceno senzorickou analýzou. Obecně byly vzorky cukrovinek s extraktem i borůvkami hodnoceny lépe, něž vzorek standardu. Vzorek BOR vykazoval nejvyšší intenzity barvy, vůně i chuti. Vzorek STD naopak kromě intenzity kyselé chuti vykazoval nejnižší hodnoty intenzity stanovovaných parametrů (viz graf 4).



Graf 4. Intenzita senzoricky hodnocených faktorů modelových cukrovinek

Z hlediska příjemnosti a celkové přijatelnosti byly vzorky EXT a BOR hodnoceny téměř srovnatelně. Přídavkem extraktu, případně borůvek tedy došlo k žádoucímu zvýšení chutnosti a přijatelnosti vzorků cukrovinek, oproti standardu (viz graf 5).



Graf 5. Příjemnost senzoricky hodnocených faktorů modelových cukrovinek

Závěr

Tato práce se zabývala přípravou želé cukrovinek s přídavkem extraktu a plodů brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus*) a charakterizací těchto cukrovinek z hlediska obsahu těkavých látek, celkového obsahu fenolických látek, antioxidační aktivity a celkového obsahu anthokyanů.

Pro výrobu cukrovinek byl použit extrakt vyrobený macerací rozmělněných plodů borůvek ve vodě v poměru 1000 g na l, při teplotě 50 °C po dobu 2 hodin.

Borůvky byly pro výrobu cukrovinek vybrány pro svůj vysoký obsah bioaktivních látek (především anthokyanů a fenolických látek), příjemnou chuť a aroma. Cukrovinky byly vyrobeny dle tradiční receptury z cukrosirupového roztoku, 7,5 % hm. želatiny a 2 % hm. kyseliny citronové. Přídavek extraktu do cukrovinek činil 25 % hm. a borůvek 15 % hm. Detekované AAL a bioaktivní látky v borůvkách a extraktu následně ovlivnily složení cukrovinek.

Samotné borůvky i připravený extrakt sice vykazovaly výrazně vyšší antioxidační aktivitu, obsah fenolických látek i anthokyanů, než vyrobené cukrovinky, nicméně s jejich přídavkem do cukrovinek došlo k výraznému zvýšení sledovaných parametrů oproti standardu (bez přídavku). Lze říci, že podstatná část sledovaných bioaktivních látek zůstala zachována i v cukrovinkách.

Z výsledků senzorické analýzy vyplývá, že současně došlo i k žádoucímu zvýšení celkové přijatelnosti cukrovinek.

Obohacené cukrovinky byly senzoricky hodnoceny srovnatelně. Z hlediska obsahu bioaktivních látek jsou

však výhodnější cukrovinky s přídavkem borůvek, které vykazovaly vyšší obsah fenolických látek, anthokyanů i vyšší antioxidační aktivitu. Proces jejich výroby je rovněž jednodušší, protože nezahrnuje krok přípravy extraktu.

Poděkování

Práce byla podpořena Standardním projektem specifického výzkumu FCH-S-23-8330. Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce doc. Ing. Evě Vítové Ph.D. a konzultantovi Ing. Matěji Rychetskému za cenné rady a pomoc při vypracování této práce.

Použitá literatura

[1] BARRECA, Davide et al. Chapter 3.6 - Bilberry (*Vaccinium myrtyllus L.*). In: NABAVI, Seyed Mohammad and SILVA, Ana Sanches. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements. Academic Press, 2018, s. 159-163. ISBN 9780128124918.

[2] COLAK, Aysen Melda et al. 2018. Identification of some Fruit Characteristics in Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) Accessions from Eastern Anatolia. In Gesunde Pflanzen, vol. 70, no. 1, pp. 31-38. ISSN 0367-4223.

[3] BENVENUTI, Stefania; BRIGHENTI, Virginia and PELLATI, Federica. 2018. High-performance liquid chromatography for the analytical characterization of anthocyanins in *Vaccinium myrtillus L*. (bilberry) fruit and food products. In Analytical and Bioanalytical Chemistry, vol. 410, no. 15, pp. 3559-3571. ISSN 1618-2642.

[4] MIKULIC-PETKOVSEK, Maja et al. 2015. A comparison of fruit quality parameters of wild bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) growing at different locations. In Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 95, no. 4, pp. 776-785. ISSN 00225142.

[5] VEGA, Erika N. et al. 2023. Wild sweet cherry, strawberry and bilberry as underestimated sources of natural colorants and bioactive compounds with functional properties. In Food Chemistry, vol. 414, pp. 135669-135669. ISSN 03088146.

[6] URBONAVICIENE, Dalia et al. 2022. Geographic Variability of Biologically Active Compounds, Antioxidant Activity and Physico-Chemical Properties in Wild Bilberries (*Vaccinium myrtillus L.*). In Antioxidants, vol. 11, no. 3, pp. 588. ISSN 2076-3921.

[7] SATER, Haley M. et al. 2020. A Review of the Fruit Volatiles Found in Blueberry and Other Vaccinium Species. In Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 68, no. 21, pp. 5777-5786. ISSN 0021-8561.

[8] ROHLOFF, Jens et al. 2009. Volatile profiles of European blueberry: Few major players, but complex aroma patterns. In Latvian Journal of Agronomy. No. 12, pp. 98-103. ISSN 1691-3485.

[9] ISMARTI, Ismarti et al. 2022. Study on Volatile Compounds of Gelatine and The Maillard Reaction Products from Different Species Using SPME-GCMS. In Science and Technology Indonesia, vol. 7, no. 2, pp. 132-139. ISSN 25804405.

Zvýšenie obsahu kmeňových buniek v kalusovom pletive z nechtíka lekárskeho (*Calendula officinalis* L.)

Increasing of stem cells proportion in callus tissue from marigold (*Calendula officinalis* L.)

Klaudia Lenkavská[1] – Šarlota Kaňuková[1,2] – Marcela Gubišová[2] – Ján Kraic[1,2]
Školiteľ: Šarlota Kaňuková[1]
[1]Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava,
[2]Výskumný ústav rastlinnej výroby, NPPC, Bratislavská cesta 122, Piešťany, 921 68
[1]lenkavska1@ucm.sk, [1]sarlota.kanukova@ucm.sk, [2]marcela.gubisova@nppc.sk, [1]jan.kraic@ucm.sk

Abstrakt
Obsah kmeňových buniek a ich pomer voči dediferencovaným bunkám v kalusovom pletive indukovanom *in vitro* z listových a koreňových explantátov nechtíka lekárskeho (*Calendula officinalis* L.) bol ovplyvňovaný dvojkrokovým predošetrením explantátov s rastovými regulátormi. V prvom kroku boli explantáty ošetrené v tekutom MS (Murashige a Skoog) médiu s rastovými regulátormi kyselinou indolyl-3-octovou (IAA) alebo kyselinou 2,4-dichlórfenoxyoctovou (2,4-D), v oboch prípadoch v koncentráciách 10 a 50 mg/L. V druhom kroku ošetrenia boli explantáty prenesené do tekutého MS média s rastovými regulátormi s nižšou koncentráciou: 0,2 mg/L IAA alebo 0,2 mg/L 2,4-D. Po 4 týždňoch indukcie kalusu na MS médiu s obsahom 1 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BAP boli mikroskopickou analýzou pozorované zmeny v počte kmeňových buniek. V prípade listových explantátov bol najvyšší počet kmeňových buniek pozorovaný po predošetrení s 10 mg/L 2,4-D, a pri koreňových explantátoch s 10 mg/L IAA, pričom zdroj auxínov v druhom kroku predošetrenia nemal vplyv na výsledný obsah kmeňových buniek pri oboch typoch explantátov.
Kľúčové slová: dediferencované bunky, kmeňové bunky, kalus, rastové regulátory, nechtík lekársky

Abstract
Content of stem cells and their ratio to dedifferentiated cells in the callus tissue, induced *in vitro* from leaf and root explants of calendula (*Calendula officinalis* L.), was influenced by two-step pretreatment of the explants with growth regulators. In the first step, explants were treated in liquid MS (Murashige and Skoog) medium with growth regulators indolyl-3-acetic acid (IAA) or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), both in concentrations of 10 and 50 mg/L, respectively. In the second treatment step, the explants were transferred to liquid MS medium with growth regulators at a lower concentration: 0.2 mg/L IAA or 0.2 mg/L 2,4-D. After 4 weeks of callus induction on MS medium containing 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP, changes in the number of stem cells were observed by microscopic analysis. In the case of leaf explants, the highest number of stem cells was observed after pretreatment with 10 mg/L 2,4-D, and in root explants with 10 mg/L IAA, while the source of auxins in the second step of pretreatment did not influence the resulting content of stem cells in both types of explants.
Key Words: dedifferentiated cells, stem cells, callus, growth regulators, marigold

Úvod

Rastlinné kmeňové bunky (SC) sú nediferencované bunky, ktoré sa vyskytujú v meristematických pletivách rastlín. Sú zodpovedné za udržanie vitality rastliny a kontinuálny prísun prekurzorových buniek [1]. Vyznačujú sa schopnosťou samoobnovy a tvorbou diferencovaných buniek [2], pričom nepodliehajú procesom starnutia. Hlavnými zdrojmi rastlinných kmeňových buniek sú apikálne a laterálne meristémy [3], v ktorých sa bunky delia počas celého života rastliny a vytvárajú tak nové orgány. Rastlinné kmeňové bunky sú aj zdrojom množstva faktorov, ktoré podporujú procesy ochrany a regenerácie ľudskej pokožky. Preto sa prvé informácie o možnosti aplikácie SC v kozmetických výrobkoch objavili už v roku 2008 [4]. *In vitro* a *in vivo* štúdie výťažkov zo SC zo švajčiarskej odrody jablone domácej (*Malus domestica* L.) Uttwiler Spätlauber, argánie trnitej (*Sideroxylon spinosum* L.), rododendronu hrdzavého (*Rhododendron ferrugineum* L.), viniča hroznorodého (*Vitis vinifera* L.), motaru prímorského (*Crithmum maritimum* L.) a rajčiaka jedlého (*Lycopersicon esculentum* Mill.) preukázali priaznivé účinky na pokožku človeka, zvlášť na proliferáciu buniek, UV-ochranu, antioxidačné

vlastnosti, vyhladenie vrások, stimuláciu expresie génov pre bunkový rast a ďalšie biologické aktivity [5]. Biologické vlastnosti rastlinných SC sa však v závislosti od rastlinného druhu vzájomne líšia [5]. Napriek širokému spektru možných aplikácií a priaznivým účinkom na človeka, rastlinné SC ostávajú stále málo preskúmané.

Objektom tejto práce bol nechtík lekársky (*Calendula officinalis* L.), ktorého využívanie siaha až do 12. storočia. V ľudovom liečiteľstve sa používa na ošetrenie malých rán, opuchov, popálenín a iných kožných problémov. Mnohé štúdie poukázali na významné protirakovinové [6, 7], antimikrobiálne [8], antioxidačné [9], UV-ochranné [10], protizápalové [11] a mnohé ďalšie účinky. Okrem toho je táto rastlina bohatá na množstvo fytochemikálií, vrátane fenolových zlúčenín, lipidov, steroidov, tokoferolov, terpenoidov, chinónov a karotenoidov [12, 13] s rozdielnymi zdraviu prospešnými účinkami.

Cieľom tejto práce bolo zvýšiť obsah kmeňových buniek v kalusovom pletive nechtíka lekárskeho *in vitro* po dvojkrokovom predošetrení listových a koreňových explantátov s rastovými regulátormi IAA a 2,4-D.

1 Materiál a metódy

V tejto kapitole si rozoberieme použitý materiál pri vypracovávaní výskumu a zároveň použité metódy pri práci.

1.1 Rastlinný materiál

Semená nechtíka lekárskeho (Zelseed s.r.o., Horná Potôň, Slovenská republika) boli povrchovo sterilizované v 96 % (v/v) etanole po dobu 30 sekúnd, v 4,7 % (v/v) roztoku chlórnanu sodného (obsiahnutého v komerčnom produkte Savo, Tatrachema, v.d., Trnava, Slovenská republika), za stáleho miešania po dobu 10 minút. Následne boli semená 4-krát opláchnuté sterilnou vodou a prenesené na pevné kultivačné MS médium [14] s vitamínmi (Duchefa Biochemie, Holandsko), s polovičným obsahom zložiek a prídavkami 0,8 % (w/v) agaru a 30 g/L (w/v) sacharózy. Klíčenie semien *in vitro* prebiehalo pri 23 ± 2°C a fotoperióde 16 hodín svetlo/8 hodín tma, po dobu 5 týždňov.

1.2 Predošetrenie explantátov a indukcia kalusu

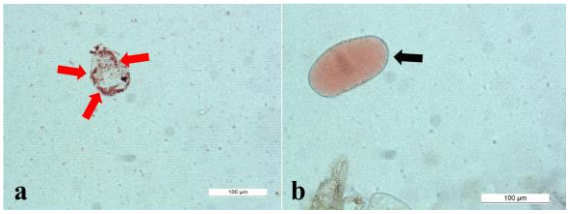
Z rastlín nechtíka lekárskeho boli sterilne odobrané listové a koreňové explantáty s veľkosťou 5 mm. Explantáty boli asepticky prenesené do tekutého MS média s prídavkom 30 g/L (w/v) sacharózy a rastovými regulátormi s koncentráciami: (i) 10 mg/L 2,4-D, (ii) 10 mg/L IAA, (iii) 50 mg/L 2,4-D, (iv) 50 mg/L IAA. Ako kontrola bolo použité tekuté MS médium bez rastových regulátorov. Predošetrenie explantátov prebiehalo 22 hod. pri teplote 4 °C. Následne boli explantáty prenesené na MS médium so zníženou koncentráciou rastových regulátorov: (i) 0,2 mg/L IAA a (ii) 0,2 mg/L 2,4-D, pričom v tomto prípade kultivácia prebiehala pri laboratórnej teplote po dobu 15 min. V tretej fáze boli explantáty prenesené na pevné MS médium s obsahom 0,8 % (w/v) agaru, 30 g/L (w/v) sacharózy s prídavkom rastových regulátorov 1 mg/L 2,4-D a 0,5 mg/L BAP. Indukcia kalusu prebiehala v tme, pri teplote 23 ± 2 °C, 4 týždne.

1.3 Analýza kmeňových buniek

Na identifikovanie SC a DDC v kalusovom pletive nechtíka lekárskeho bola použitá modifikovaná metóda farbenia vakuol [15]. Mikroskopické pozorovanie bolo uskutočnené v troch technických a troch biologických opakovaniach pomocou mikroskopu Leica DM6000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Nemecko). Obsah a podiel SC voči DDC boli hodnotené subjektívnym pozorovaním, keďže počítanie buniek v kalusovom pletive nie je technicky možné, respektíve nie je presné.

2 Výsledky a diskusia

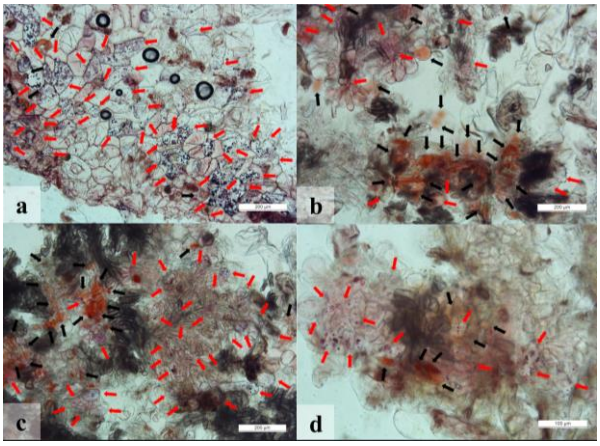
Na mikroskopickú analýzu bolo odobraté kalusové pletivo indukované z listových a koreňových explantátov, po príslušnom type predošetrenia. Na odlíšenie kmeňových (SC) a dediferencovaných buniek (DDC) bolo použité 0,01 % farbivo Neutral Red špecificky farbiace vakuoly [15]. Prítomnosť početného množstva malých vakuol je charakteristická pre rastlinné kmeňové bunky (Obr. 1a) [16], zatiaľ čo prítomnosť jednej veľkej vakuoly je typická pre dediferencované bunky (Obr. 1b) [17-19].



Obr. 1: Mikroskopické odlíšenie (**a**) kmeňových buniek (SC), (**b**) dediferencovaných buniek (DDC). Početné vakuoly v SC sú označené červenými šípkami, jedna veľká vakuola v DDC je označená čiernou šípkou. Mierka 100 µm.
Zdroj: [20].

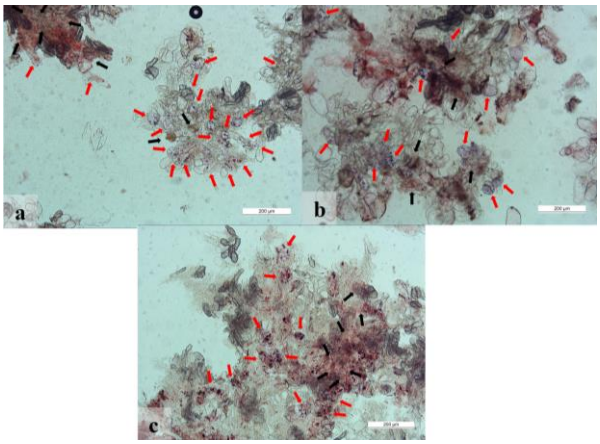
He a kol. v roku 2021 predošetrovali stonkové explantáty jaseňa mandžuského (*Fraxinus mandshurica*

Rupr.) rastovými regulátormi IAA a IBA. Uviedli, že po predošetrení stonkových explantátov s 50 mg/L IBA, pri 4 °C, počas 22 hod. a následnom predošetrení s 0,2 mg/L IBA, 15 min., pri teplote 25 °C, bola miera indukcie kambiálnych meristematických buniek najvyššia (vyššia o 83,0 % oproti kontrole) [21]. Keďže nechtík lekársky, a samotné SC, predstavujú perspektívu v oblasti kozmetiky, v našej práci boli predošetrené explantáty rastovými regulátormi za účelom zvýšenia produkcie SC, pričom namiesto IBA bola použitá 2,4-D. Mikroskopickou analýzou buniek z kalusového pletiva iniciovaného z listového explantátu predošetreného s 10 mg/L 2,4-D bol, v porovnaní s kontrolou, pozorovaný výrazný nárast počtu SC a iba občasný výskyt DDC (Obr. 2a,d). Naopak, pri predošetrení s 50 mg/L 2,4-D (Obr. 2b) bola pozorovaná zvýšená produkcia DDC oproti SC. V porovnaní s kontrolou bolo zistené, že aplikácia 50 mg/L 2,4-D indukovala zvýšenú produkciu DDC. Keďže cieľom experimentálnej činnosti nebolo zvýšenie produkcie DDC, ale SC, tento typ predošetrenia bol v prípade kalusov z listových explantátov vylúčený. Po predošetrení s IAA v koncentrácii 50 mg/L bolo zistené, že v porovnaní s kontrolou došlo k zvýšeniu obsahu SC, za súčasného zvýšenia množstva DDC. Porovnaním tohto typu predošetrenia, spolu s kontrolou, bolo zistené, že zastúpenie SC bolo s kontrolou porovnateľné. Rovnako ako v prípade 50 mg/L 2,4-D, bolo predošetrenie s 50 mg/L IAA vylúčené. V prípade kalusového pletiva, po predošetrení listových explantátov s 10 mg/L IAA, v porovnaní s predošetreniami s 50 mg/L IAA a 2,4-D bol pozorovaný nárast množstva SC, avšak po porovnaní s 10 mg/L 2,4-D bola prítomnosť SC viditeľne nižšia (Obr. 2).



Obr. 2: Porovnanie obsahu SC a DDC po predošetrení listových explantátov *C. officinalis* L. s: (**a**) 10 mg/L 2,4-D (**b**) 50 mg/L 2,4-D (**c**) 10 mg/L IAA (d) kontrola. SC sú označené červenými šípkami, DDC bunky čiernymi šípkami. Mierka (**a,b,c**) 200 µm, (**d**) 100 µm.
Zdroj: Autori

Na základe výsledkov možno konštatovať, že v prípade listových explantátov bolo najvhodnejšia predošetrenie s 10 mg/L 2,4-D. Rovnaký postup bol uskutočnený aj v prípade kalusových pletív iniciovaných z koreňových explantátov. Pri ich mikroskopickom pozorovaní po ošetrení s 10 mg/L IAA bolo pozorované väčšie množstvo SC, v porovnaní s kontrolou (Obr. 3a,c). Pri porovnávaní 10 mg/L 2,4-D s 10 mg/L IAA bola v prípade 10 mg/L 2,4-D pozorovaná znížená prítomnosť SC, za súčasného zvýšenia množstva DDC. Keďže množstvo SC a aj DDC bolo približne porovnateľné s kontrolou (Obr. 3), tento typ predošetrenia za účelom zvýšenia produkcie KB bol vylúčený. Pri pozorovaní kalusového pletiva po predošetrení 50 mg/L IAA došlo k priamo úmernému nárastu aj DDC aj SC. Ich pomerné zastúpenie v kalusovom pletive bolo približne 1:1, na základe čoho bol aj tento typ predošetrenia vylúčený. Porovnaním preošetrenia koreňových explantátov s 50 mg/L 2,4-D s predošetrením s IAA s rovnakou koncentráciou bolo pozorované, že pri aplikácii 2,4-D bol obsah SC vyšší, ako v prípade IAA. Za súčasného porovnania 50 mg/L 2,4-D s 10 mg/L IAA bol obsah SC nižší, ako v prípade predošetrenia s 10 mg/L IAA (Obr. 3a,b).



Obr. 3: Porovnanie množstva SC a DDC po predošetrení koreňových explantátov *C. officinalis* L. s: (**a**) 10 mg/L IAA (**b**) 50 mg/L 2,4-D (**c**) kontrola. SC sú označené červenými šípkami, DDC bunky čiernymi šípkami. Mierka 200 µm.
Zdroj: Autori

Zhrnutím pozorovaní vyplynulo, že za účelom zvýšenej produkcie SC je v prípade koreňového

explantátu najvhodnejším predošetrením použitie IAA s koncentráciou 10 mg/L.

Záver

Po predošetrení explantátov s rastovými regulátormi bolo dosiahnuté zvýšenie počtu kmeňových buniek nechtíka lekárskeho (*Calendula officinalis* L.) v kalusovom pletive iniciovanom z listových aj koreňových explantátov. V prípade listového explantátu bol najvhodnejší spôsob predošetrenia pomocou 10 mg/L 2,4-D, v prípade koreňových explantátov pomocou 10 mg/L IAA. V 2. kroku predošetrenia (0,2 mg/L IAA/2,4-D) nebol pozorovaný vplyv použitého zdroja auxínov na výsledný obsah kmeňových buniek ani pri jednom z oboch typov explantátov.

Poďakovanie

Práca vznikla s podporou Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch a projektu "*Udržateľné systémy inteligentného farmárstva zohľadňujúce výzvy budúcnosti*" 313011W112 z Operačného programu Integrovaná infraštruktúra, spolufinancovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Použitá literatúra

[1] BATYGINA, Tatiana. 2011. Stem cells and morphogenetic developmental programs in plants. In Stem cell research Journal, vol. 3, no. 1, pp. 45-120. ISSN 1873-5061.

[2] XU, Lin – HUANG, Hai. 2014. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. In Current Topics in Developmental Biology, vol. 108, pp. 1-33. ISSN 1557-8933.

[3] DODUEVA, Irina et al. 2017. Plant stem cells: unity and diversity. In Russian Journal of Genetics: Applied Research, vol. 7, no. 4, pp. 385-403. ISSN 2079-0600.

[4] SCHMID, Daniel et al. 2008. Plant Stem Cell Extract for Longevity of Skin and Hair. In International Journal for Applied Science, vol. 134, pp. 29-35. ISSN 2208-2182.

[5] KAZMIERSKI, Łukasz – ROSZKOWSKI, Szymon. 2019. Plant stem cells culture – a new tool for skin protection and regeneration. In Medical Research Journal, vol. 4, pp. 52-57. ISSN 2249-4618.

[6] JIMÉNEZ-MEDINA, Eva et al. 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. In BMC Cancer, vol. 6 , pp. 119. ISSN 1471-2407.

[7] MAZZIO, Elizabeth A. – SOLIMAN, Karam F.A. 2009. *In vitro* screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs. In Phytotherapy Research: PTR, vol. 23, no.3, pp. 385-398. ISSN 1099-1573.

[8] DUMENIL, Gérard. et al. 1980. Evaluation of antibacterial properties of marigold flowers (*Calendula officinalis* L.) and other homeopathic tinctures of *C. officinalis* L. and *C. arvensis* L. In Annales Pharmaceutiques Francaises, vol. 38, no. 6, pp. 493- 499. ISSN 0003-4509.

[9] ÇETKOVIC, Gordana et al. 2004. Antioxidant properties of marigold extracts. In Food Research International, vol. 37, no. 7, pp. 643-650. ISSN 1873-7145.

[10] MISHRA, Ak et al. 2012. Assessment of *In vitro* Sun Protection Factor of *Calendula Officinalis* L. (*Asteraceae*) Essential Oil Formulation. In Journal of Young Pharmacist, vol. 4, no. 1, pp. 17-21. ISSN 0975-1505.

[11] HAMBURGER, Matthias et al. 2003. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). In Fitoterapia, vol. 74, no. 4, pp. 328-338. ISSN 0367-326X.

[12] WOJCIAK-KOSIOR, Magdalena et al. 2003. Investigations of phenolic acids occurring in plant components of Naran N by HPLC and HPTLC densitometric methods. In Herba Polonica, vol. 49, pp. 194-201. ISSN 2449-8343.

[13] KISHIMOTO, Sanae et al. 2005. Analysis of carotenoid composition in petals of *Calendula* (*Calendula officinalis* L.). In Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, vol. 69, no. 11, pp. 2122-2128. ISSN 1347- 6947.

[14] MURASHIGE, Toshio – SKOOG, Folke. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In Plant Physiology, vol. 15, pp. 473-497. ISSN 0032-0889.

[15] DUBROVSKY, Joseph G. et al. 2006. Neutral red as a probe for confocal laser scanning microscopy studies of plant roots. In Annals of Botany, vol. 97, no. 6, pp. 1127-1138. ISSN 0305-7364.

[16] FRANKENSTEIN, Claus et al. 2005. The onset of cambium activity – A matter of agreement? In Dendrochronologia, vol. 23, pp. 57–62. ISSN 1125-7865.

[17] LEE, Eun-Kyong et al. 2010. Cultured cambial meristematic cells as a source of plant natural products. In Nature Biotechnology, vol. 28, pp. 1213-1217. ISSN 1546-1696.

[18] ZHANG, Yuhua et al. 2017. Accumulation of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin and the transcriptional expression of camptothecin biosynthetic genes in *Camptotheca acuminata* cambial meristematic and dedifferentiated cells. In RSC Advances, vol. 7, pp. 12185-12193. ISSN 2046- 2069.

[19] SONG, Yadi et al. 2019. A novel strategy to enhance terpenoids production using cambial meristematic cells of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. In Plant Methods, vol. 15, no. 1, pp. 1-13. ISSN 1746-4811.

[20] KAŇUKOVÁ, Šarlota et al. 2024. Suspension culture of stem cells established of *Calendula offcinalis* L. In Scientific Reports, vol. 14, art. no. 441. ISSN 2045-2322.

[21] HE, Liming et al. 2021. Establishment of the technology of cambial meristematic cells (CMCs) culture from shoots and high expression of *FmPHV* (*PHAVOLUTA*) functions in identification and differentiation of CMCs and promoting the shoot regeneration by hypocotyl in *Fraxinus mandshurica*. In Plant Physiology and Biochemistry, vol. 160, pp. 352-364. ISSN 1873-2690.

Produkcia biomasy kalusu z durmanu obyčajného (*Datura stramonium* L.)

Production of callus biomass of thornapple (*Datura stamonium* L.)

Sofia Mikulášková[1] – Šarlota Kaňuková[1,2] – Ján Kraic[1,2]
Školiteľka: Šarlota Kaňuková[1,2]
[1]Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
[2]Výskumný ústav rastlinnej výroby, NPPC, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany
[1]mikulaskova1@ucm.sk, [1]sarlota.kanukova@ucm.sk, [1]jan.kraic@ucm.sk

Abstrakt
Durman obyčajný je rastlina zaujímavá z pohľadu obsahových látok a ich praktického využitia. Najzaujímavejšími sú tropánové alkaloidy hyoscyamín (atropín) a skopolamín. Aby sa dalo uvažovať o produkcii tropánových alkaloidov *in vitro* cieľom tejto práce bolo nájsť najlepšiu kombináciu rastových regulátorov pre indukciu kalusu *in vitro*, v tomto prípade z listových a stonkových explantátov. Pri listových explantátoch sa ako najvhodnejšia kombinácia auxínu a cytokinínu ukázala 2,4-D (kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová) + TDZ (tiadiazurón). Pri stonkových explantátoch boli vhodné tri kombinácie 2,4-D s KIN (kinetín), TDZ, i 2iP (6-(γ,γ-dimetylalamino)purín). Pri listových aj stonkových explantátoch bolo použitie auxínu NAA (kyselina 1-naftyloctová) nevhodné, pretože bola pozorovaná masívna regenerácia orgánov rastliny.
Kľúčové slová: durman obyčajný, *Datura stramonium* L., kalus, rastové regulátory

Abstract
Thornapple is an interesting plant species from the point of its chemical compopunds and their practical use. The most interesting are the tropane alkaloids hyoscyamine (atropine) and scopolamine. To consider the production of tropane alkaloids in vitro, the aim of this work was to find the best combination of growth regulators for in vitro callus induction, in this case from leaf and stem explants. For leaf explants, growth regulators 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) + TDZ (thiadiazuron) proved to be the most suitable combination of auxin and cytokinin. Three combinations of 2,4-D i.e., with KIN (kinetin), TDZ, and 2iP (6-(γ,γ-dimethylalamino)purine) were suitable for stem explants. In both leaf and stem explants, the use of auxin NAA (1-naphthylacetic acid) was inappropriate due to massive regeneration of plant organs.
Key Words: thornapple, *Datura stramonium* L., callus, growth regulators

Úvod

Kalusové kultúry sú zvyčajne medzistupňom pri rôznych typoch *in vitro* kultúr rastlín. Aj cez kalusy vedie cesta k procesom organogenézy, aj somatickej embryogenézy. Vtedy je však cieľom regenerovať rastlinu. Samotné kalusové kultúry bývajú niekedy konečným cieľom, napríklad pri produkcii sekundárnych metabolitov určených pre farmaceutický ale tiež kozmetický, potravinársky, či iný priemysel. Fytochemikálie v bunkách kalusových kultúr iniciovaných z liečivých druhov rastlín sa môžu použiť vo forme extraktov alebo purifikovaných látok, na rôzne účely, pretože sú chemicky veľmi rozmanité [1,2]. Kalusové kultúry je možné využívať na produkciu sekundárnych metabolitov priamo, bez potreby pestovania rastlín v pôde. Technológia kultivácie kalusov iniciovaných v *in vitro* kultúrach tak môže pomôcť chrániť vzácne a ohrozené rastlinné druhy využívané na produkciu sekundárnych metabolitov [1].

Medzi producentov žiadaných sekundárnych metabolitov patrí aj durman obyčajný (*Datura stramonium* L.). Je to kvitnúca, jednoročná, jedovatá bylina z čeľade *Solanaceae* [3,4], ktorá je známa pre obsah látok s omamnými a halucinogénnymi účinkami [5]. Rod *Datura* obsahuje viaceré druhy produkujúce veľké množstvo sekundárnych metabolitov, ktoré majú široké využitie. Hyoscyamín (atropín) a skopolamín, ktoré sa v durmane nachádzajú, hrajú dôležitú úlohu najmä vo farmaceutickom priemysle. Majú veľa zaujímavých účinkov, napríklad antimikrobiálny, antidiabetický, antiastmatický, antioxidačný, antiepileptický, analgetický, repelentný a iné [6,7].

Cieľom tejto práce bolo indukovať kalogenézu *in vitro* z listových a stonkových segmentov durmanu obyčajného, dlhodobo kultivovať kalusy a produkovať

tak kalusovú biomasu, potenciálne využiteľnú na produkciu tropánových alkaloidov *in vitro*.

1 Materiál a metódy

1.1 Príprava donorových rastlín

Explantáty boli odoberané z donorových klíčencov získaných na kultivačnom médiu ½MS (médium Murashige & Skoog) [8] (Duchefa Biochemie, Haarlem, Holandsko) v *in vitro* podmienkach, zo zrelých semien durmanu obyčajného. Semená boli najskôr 20 minút skarifikované v koncentrovanej kyseliny sírovej. Následne boli 4-krát premyté v sterilnej vode a povrchovo sterilizované 30 sekúnd v etanole a 15 minút v 4,7% chlórnane sodnom (komerčný prípravok Savo) s prídavkom Tween 20, za kontinuálneho miešania. Semená boli následne 3-krát premyté v sterilnej vode (2 minúty, 5 minút, niekoľko sekúnd) osušené a uložené na ½MS médiu s prídavkom agaru, pH 5,7- 5,8. Kultivované boli 4 týždne pri teplote 23°C±2°C.

1.2 Indukcia kalusu

Listové a stonkové segmenty boli odobrané z rastlín asepticky kultivovaných na ½MS médiu. Veľkosť listového explantátu bola približne 10 x 10 mm a dĺžka stonkového explantátu približne 10 mm. Explantáty boli kultivované na MS médiu s agarom a rôznymi kombináciami rastových regulátorov: 2 mg/L auxínu + 0,5 mg/L cytokinínu (Tabuľka 1). Kultivácia prebiehala v tme, pri teplote 23°C±2°C, počas 16 týždňov. Indukované kalusy boli 3- krát pasážované – po 4, 8 a 12 týždňoch na čerstvé MS médiá s rovnakými rastovými regulátormi. Kalusy boli v rovnakom čase vážené a vyhodnotené boli prírastky ich čerstvej hmotnosti. Po 4 mesiacoch boli získané údaje štatisticky vyhodnotené a vybrané najvhodnejšie kombinácie rastových regulátorov.

Tabuľka 1: Kombinácie rastových regulátorov v MS médiu na indukciu kalogenézy

Označenie kombinácie rastových regulátorov	Auxín (2 mg/L)	Cytokinín (0,5 mg/L)
1	2,4-D	KIN
2	2,4-D	2iP
3	2,4-D	TDZ
4	NAA	KIN
5	NAA	2iP
6	NAA	TDZ
7	-	-

1.3 Vyhodnotenie kalogenézy

Účinky použitých rastových regulátorov na indukciu a rast kalusu boli sledované v piatich opakovaniach, pričom v každom z nich boli štyri explantáty získané z listov, resp. stoniek. Hodnotené parametre zahŕňali deň počiatočnej tvorby kalusu, percento tvorby kalusu, morfologické parametre, vrátane farby a štruktúry kalusu a čerstvá hmotnosť kalusu. Získané údaje boli vyhodnotené analýzou rozptylu (one-way ANOVA) a následne testom najmenšieho významného rozdielu (LSD) pomocou softvéru Statgraphics verzia 19.2.01 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, USA). Významné rozdiely medzi priemermi boli porovnané pomocou testu najmenšieho významného rozdielu (LSD) na 5 % hladine významnosti ($p < 0,05$).

2 Výsledky a diskusia

Kalusy boli indukované z oboch typov explantátov a na každej kombinácii rastových regulátorov v MS médiu, pričom vznikali kalusy s kompaktnou štruktúrou. Prevládala biela až svetložltá farba kalusov. V prípade MS médií s auxínom 2,4-D nebola pozorovaná žiadna tvorba regenerujúcich štruktúr. Naopak, na médiách typov 4, 5 a 6 (Tabuľka 1), kde bola auxínom NAA, bola pozorovaná masívna regenerácia koreňov (médiá 4, 5) a listov a výhonkov (médium 6).

V prvej časti boli vyhodnotené parametre indukovaných kalusov. Po prvých 4 týždňoch bolo hodnotené percento indukcie kalusu, jeho štruktúra, zafarbenie a prípadná tvorba regenerujúcich štruktúr. Výsledky týkajúce sa listových explantátov sú uvedené v Tabuľke 2.

Tabuľka 2: Charakteristiky kalogenézy a kalusov indukovaných z listových explantátov na rôznych kombináciách rastových regulátorov (Tabuľka 1)

Médium	Frekvencia kalogenézy [%]	Štruktúra	Farba kalusu	Tvorba orgánov
1	100	Kompaktná	Biela, svetlo žltá, hnedá	-
2	100	Kompaktná	Biela, svetlo žltá, hnedá	-
3	100	Kompaktná	Biela, svetlo žltá	-
4	100	Kompaktná	Biela, svetlo žltá, hnedá	Koreň
5	100	Kompaktná	Biela, svetlo žltá, hnedá, zelená	Koreň

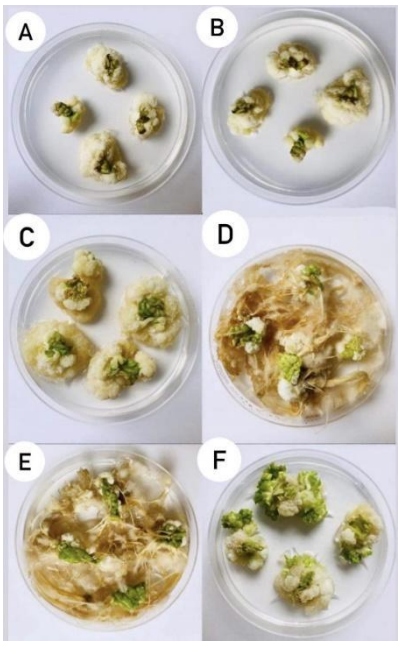
6	100	Kompaktná	Svetlo žltá, biela, hnedá	Listy / výhonky
7	0	-	-	-

V prípade stonkových explantátov boli pozorované rovnaké charakteristiky ako v prípade listových explantátov (Tabuľka 3).

Tabuľka 3: Charakteristiky kalogenézy a kalusov indukovaných zo stonkových explantátov na rôznych kombináciách rastových regulátorov

Médium	Frekvencia kalogenézy [%]	Štruktúra	Farba kalusu	Tvorba orgánov
1	100	Kompaktná	Biela, svetlo žltá, hnedá	--
2	100	Kompaktná	Biela, svetlo žltá, hnedá	--
3	100	Kompaktná	Biela, svetlo žltá, hnedá, zelená	--
4	100	Kompaktná	Biela, svetlo žltá, hnedá, zelená	Koreň
5	100	Kompaktná	Biela, svetlo žltá, hnedá, zelená	Koreň/ výhonky
6	100	Kompaktná	Svetlo žltá, biela, hnedá, zelená	Výhonky
7	0	-	-	-

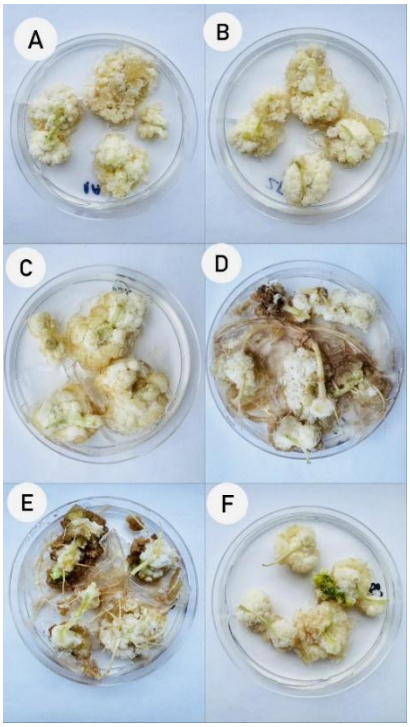
Na Obrázku 1 sú porovnané kalusy indukované z listových segmentov na médiách s rôznymi kombináciami rastových regulátorov.



Obr. 1 Kalusy iniciované z listových explantátov po 16 týždňoch kultivácie (A – 2,4-D+KIN, B – 2,4-D+2iP, C – 2,4-D+TDZ, D – NAA+KIN, E – NAA+2iP, F – NAA+TDZ). Zdroj: Autori

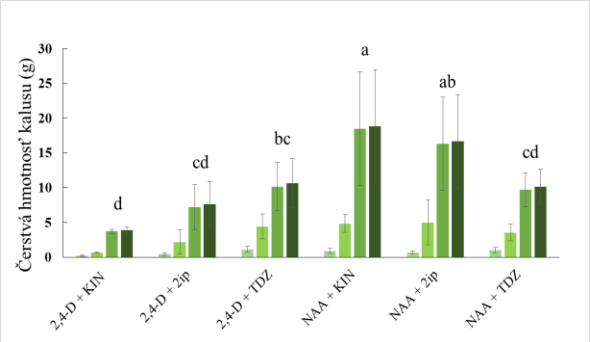
Najvhodnejšou bola kombinácia (typ média) číslo 3, keďže kalusy v tomto prípade boli najväčšie a bez regenerujúcich štruktúr. Na kontrolnom médiu (bez rastových regulátorov) nebol pozorovaný vznik kalusu. Amiri a kol. [9] testovali vplyv rôznych rastových regulátorov na listové explantáty, pričom ich výsledky uvádzajú, že najvhodnejšia kombinácia bola práve kombinácie 2,4-D+KIN, čo sa v našom prípade nepotvrdilo. Rovnako Rahman a kol. [10] uviedli ako najlepšiu kombináciu na tvorbu kalusu 2,4-D+KIN.

Kalogenéza na stonkových explantátoch sa výrazne nelíšila od výsledkov získaných pri listových explantátoch. V kalusoch zo stonkových explantátov bola pozorovaná väčšia farebnosť. Výrazným rozdielom bola regenerácia výhonkov na médiu číslo 5 (NAA + 2iP), čo pri listoch nebolo pozorované. Na Obrázku 2 sú porovnané kalusy iniciované zo stonkových explantátov po 16 týždňoch kultivácie. Pozorovaný bol masívnejší rast kalusov, najmä na médiách číslo 2 a 3, pričom tieto médiá nie sú vhodné pre produkciu kalusovej biomasy.



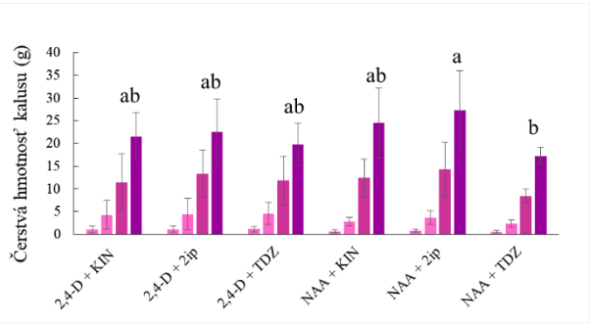
Obr. 2 Kalusy iniciované zo stonkových explantátov po 16 týždňoch kultivácie (A – 2,4-D+KIN, B – 2,4-D+2iP, C – 2,4-D+TDZ, D – NAA+KIN, E – NAA+2iP, F – NAA+TDZ) Zdroj: Autori

V ďalšej časti bola hodnotená čerstvá hmotnosť kalusov pre určenie najlepšej kombinácie rastových regulátorov pre dlhodobý nárast hmotnosti kalusovej biomasy. Kalusy boli vážené každé 4 týždne a na základe priemernej hmotnosti získanej z každej kombinácie rastových regulátorov štatisticky vyhodnotené. V prípade listových explantátov bola pozorovaná najvyššia čerstvá hmotnosť kalusovej biomasy na kombinácii číslo 4 (Graf 1), čo sa potvrdilo aj štatisticky. Hmotnosť kalusovej biomasy z médií 4 a 5 však bola negatívne ovplyvnená veľkým množstvom regenerujúcich koreňov. Keďže kalus s regenerujúcimi štruktúrami nebol vhodný pre ďalšie pokračovanie tohto experimentu, ako najvhodnejšia kombinácia bola vybraná kombinácia číslo 3.



Graf 1 Nárast čerstvej hmotnosti kalusovej biomasy indukovanej z listových explantátov (exponenty a, b, c, d, e označujú štatisticky významné rozdielne v priemerné priemerných hodnotách, p<0,05).

V prípade stonkových explantátov bol štatisticky najvhodnejší typ média na rast kalusovej biomasy číslo 5 (Graf 2). Aj tu však bola hmotnosť kalusov skreslená prítomnými regenerujúcimi štruktúrami. Štatisticky boli kombinácie 1, 2, 3 a 4 na rovnakej úrovni. Kombinácia 4 tiež obsahovala regenerujúce štruktúry, preto ako najhodnejšie boli vybrané médiá 1, 2 a 3.



Graf 2: Nárast čerstvej hmotnosti kalusovej biomasy indukovanej zo stonkových explantátov (exponenty a, b, c, d, e označujú štatisticky významné rozdielne v priemerné priemerných hodnotách, p<0,05).

Závery

Auxín 2,4-D bol vhodnejší na indukciu kalusov z listových aj stonkových explantátov durmanu obyčajného. Pre listové explantáty bola najhodnejšia kombinácia auxínu 2,4-D a cytokinínu TDZ. V prípade stonkového explantátu boli najlepšie kombinácie 2,4- D + KIN, 2,4-D + TDZ a 2,4-D + 2iP. Kalusovú biomasu indukovanú z listových aj stonkových explantátov bolo možné kontinuálne kultivovať, aj s kontinuálnym nárastom čerstvej hmotnosti kalusovej biomasy. To dáva predpoklad na možnosť založenia dlhodobých kalusových kultúr s nárastom kalusovej biomasy, čo by v prípade produkcie zaujímavých sekundárnych

metabolitov v bunkách kalusov mohlo byť alternatívnym postupom na ich produkciu *in vitro.*

Poďakovanie

Práca vznikla s podporou Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch a projektu FPPV-05-2024 ,,Zavedenie účinného *in vitro* produkčného systému durmanu obyčajného a sledovanie vplyvu rastlinných vírusov na produkciu tropánových alkaloidov" podporeného z Fondu na podporu výskumu na Univerzite sv. Cyrila a Metoda v Trnave (Plán obnovy a odolnosti).

Použitá literatúra

[1] EFFERTH, T. 2019. Biotechnology applications of plant callus cultures. In *Engineering*. ISSN 2095-8099, 2019, roč. 5, č. 1, s. 50-59.

[2] IKEUCHI, M. a kol. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and represion. In *The Plant Cell*. ISSN 1532-298X, 2013, roč. 25, č. 9, s. 3159–3173.

[3] SAYYED, A. - SHAH, M. 2014. Pharmacological and traditional uses of *Datura stramonium* L. In *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. ISSN 1482-1826, 2014, roč. 2, s. 123-125

[4] SONI, P. a kol. 2012. Pharmacologickal properties of *Datura stramonium* L. as a potential medicinal tree: an overview. In *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* ISSN 2588-9222, 2012, roč. 2, s. 1002-1008

[5] MUKHTAR, Y. a kol. 2019. An overview on *Datura stramonium* L. (Jimson Weed): a notable psychoactive drug plant. In *American Journal of Natural Sciences.* ISSN 2957-7268, 2019, roč. 2, s. 1-9

[6] ALAM, W. a kol. 2020. *Datura metel*: a review on chemical constituents, traditional uses and pharmacological activities. In *Current Pharmaceutical Design*. ISSN 1873-4316, 2020, roč. 27, s. 2545-2557

[7] AL-SNAFI, A. E. 2017. Medical importance of *Datura fastuosa* (syn: *Datura metel*) and *Datura stramonium* – a review. In *IOSR Journal of Pharmacy.* ISSN 2250-3013, 2017, roč. 7, s. 43-58

[8] MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962. A Revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. In Physiologia Plantarum, ISSN 1399-3054, 1962, roč. 15, s. 473-497.

[9] AMIRI, S. a kol. 2010. *In vitro* propagation and whole plant regeneration from callus in *Datura (Datura stramonium L.*). In *African Journal of Biotechnology*. ISSN 1684–5315, 2010, roč. 10, č. 3, s. 442-448

[10] RAHMAN, R. A. a kol., 2014. Effect od sodium chloride on tropane alkaloids accumulation and proline content in *Datura metel* and *D. stramonium* callus cultures. In *International Journal od Advanced Biological and Biomedical Research*. ISSN 2322-4827, roč. 1, č. 2, s. 197-210

Sledovanie zmien celkového proteómu, fotosyntetických pigmentov a prolínu pri kultivácii *Euglena gracilis* v tme

Tracking changes in total proteome, photosynthetic pigments and proline during dark cultivation of *Euglena gracilis*

Adriana Paprčková[1] – Jana Moravčíková[2] – Maksym Danchenko[3] – Ľubica Uváčková[1]
Školiteľka: Ľubica Uváčková[1]
[1]Oddelenie biológie, Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava,
[2]Oddelenie biotechnológií, Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava,
[3]Chemický ústav, Slovenská Akadémia Vied, Dúbravska cesta 9, 845 38 Bratislava,
paprckova1@ucm.sk, lubica.uvackova@ucm.sk

Abstrakt
Euglena gracilis je fotosyntetická mikroriasa, ktorá vďaka svojej metabolickej adaptabilite dokáže rásť pri autotrofných aj heterotrofných podmienkach. V našom experimente sme bunky *E.gracilis* kultivovali v Cramer-Myersovom médiu na svetle a v tme. Zistili sme, že kultúry kultivované na svetle vykazovali charakteristické zelené sfarbenie, pričom bunky kultivované v tme boli svetlé, bez charakteristického zeleného sfarbenia. Prostredníctvom biochemickej analýzy sme spektrofotometricky stanovili koncentráciu fotosyntetických pigmentov a obsah prolínu v bunkách kultivovaných na svetle a v tme. Pri kultivácii v tme došlo ku štatistickému zníženú koncentrácie chlorofylov *(a, b, celkového chlorofylu)* a karotenoidov v porovnaní s bunkami kultivovanými na svetle. Pri stanovení obsahu prolínu sme spozorovali opačný trend. V tme došlo k nárastu obsahu prolínu v porovnaní s kultiváciou na svetle. Celkový proteóm sa taktiež v tme zmenil, identifikovali sme 163 proteínov, ktoré sme zatriedili do 12 funkčných skupín. Najviac identifikovaných proteínov sme zatriedili do kategórie metabolizmus a energia.

Kľúčové slová: *Euglena gracilis,* fotosyntetické pigmenty, prolín, proteóm, proteíny

Abstract
Euglena gracilis is a photosynthetic microalga that, thanks to its metabolic adaptability, can grow under both autotrophic and heterotrophic conditions. In our experiment, *E.gracilis* cells were cultured in Cramer-Myers medium in the light and in the dark. We found that cultures cultured in the light showed a characteristic green coloration, while cells cultured in the dark were bright, without a characteristic green coloration. Through biochemical analysis, we spectrophotometrically determined the concentration of photosynthetic pigments and the content of proline in cells cultured in light and darkness. When cultured in the dark, there was a statistically reduced concentration of chlorophylls (*a, b, total chlorophyll*) and carotenoids compared to cells cultured in the light. When determining the proline content, we observed the opposite trend. There was an increase in proline content in the dark compared to light cultivation. The total proteome also changed in the dark, we identified 163 proteins, which we classified into 12 functional groups. We classified the most identified proteins into the metabolism and energy category.

Key Words: *Euglena gracilis,* photosynthetic pigments, proline, proteome, proteins.

Úvod
Euglena gracilis je eukaryotický, jednobunkový a fotosyntetický organizmus zaraďovaný do taxónu Euglenozoa. Vyskytuje sa v prírode v sladkých a brakických vodách, kde dokáže vytvárať biofilmy. Dokáže prežiť v odpadových vodách ale aj v prostredí s vysokou koncentráciou ťažkých kovov, preto slúži ako vhodný bioindikátor znečistenia prostredia. Je to obligátny a mixotrofný bičíkovec, ktorého primárny spôsob výživy je fototrofia. Adaptabilita metabolizmu mu umožňuje rásť v rôznych kultivačných podmienkach ako sú autotrofia (s použitím slnečného svetla), heterotrofia (s použitím externého zdroja uhlíka) a mixotrofia (s kombináciou oboch režimov) [1]. *E.gracilis* je metabolicky všestranná vďaka svojmu genómu, ktorý kóduje množstvo enzýmov. Väčšina

týchto enzýmov je regulovaná post-transkripčne, čo umožňuje bunkám rýchlo sa adaptovať na zmeny v ich prostredí [2]. Ako zdroj uhlíka a energie využíva rôzne organické zlúčeniny. V rôznych kultivačných podmienkach vykazuje *E.gracilis* odlišné stupne získavania svetla a fotosyntézy, čo súvisí s jej metabolickou dráhou. Chlorofyly sú najrozšírenejšie prírodné pigmenty, ktoré dodávajú mikroriasam ich zelenú farbu a sú nevyhnutné pre proces fotosyntézy, pri ktorom mikroriasy získavajú energiu na metabolické procesy a rozmnožovanie. Vyšší pomer chlorofylu a/chlorofylu *b* súvisí svyššou fotosyntetickou aktivitou a rýchlejším rastom buniek [9]. V prípade nepriaznivých podmienok sa obsah chlorofylov zníži. Slabé osvetlenie môže mať obmedzujúci účinok na rast mikrorias a príliš vysoké osvetlenie môže mať inhibičný účinok [11]. Intenzita svetla priamo ovplyvňuje rýchlosť fotosyntézy. Pri nadmernom osvetlení môže dôjsť k fotooxidačnému poškodeniu fotosyntetického aparátu a fotoinhibícii – zníženiu účinnosti a rýchlosti fotosyntéz [8]. Počas fotoinhibície môže v bunkách dôjsť k zvýšenej produkcii reaktívnych foriem kyslíka (ROS). V malom množstve plnia signalizačnú funkciu a spúšťajú rôzne mechanizmy proti stresu, ale ich vysoké koncentrácie vedú k poškodeniu bunkových štruktúr a transformácii fyziologických a biochemických procesov. V dôsledku reakcie na stres dochádza k zmenám v zložení a pomere chlorofylov, karotenoidov, lipidov a mastných kyselín [10]. Stanovenie množstva prolínu odzrkadľuje určitý fyziologický stav, prostredníctvom ktorého dokážeme posúdiť odolnosť rastlín voči stresu. Pomáha mikroriasam vyrovnať sa so stresovými podmienkami úpravou bunkového osmotického tlaku. Prispieva k detoxikácii ROS, ochrane integrity membrány a stabilizácii enzýmov/proteínov [12].

1 Materiál a metódy

Na všetky experimenty sme použili *Euglena gracilis* kmeň Z, ktorý bol získaný zo SAG 1224-5/25 Collection of Algae, Göttingen, Nemecko.

1.1 Kultivácia buniek

Bunky *E.gracilis* sme kultivovali v 50 ml Cramer-Myersovom médiu (CMM), ktoré bolo pripravené a upravené podľa Cramer a Myers [3]. Do každej banky sme pridali 300 µl 96 % etanolu, 250 µl vitamínu B1 a 10 µl vitamínu B12. Následne sme pridali 300 µl média s kultúrou *E.gracilis*. Kultúry sme staticky kultivovali 7dní v kultivačnej miestnosti pri teplote 21°C pri stálom osvetlení s intenzitou osvetlenia 30 µmol.photons.m^{-2} .s^{-1}, pričom druhú časť kultúr sme kultivovali v tme za rovnakých podmienok.

1.2 Rastová krivka

Rastové krivky sme zhotovili na základe pravidelného počítania buniek v Bürkerovej komôrke. Na počítanie sme využili mikroskop OLYMPUS CX23. Na znehybnenie buniek sme použili 100 µl formaldehydu, ktorý bunky usmrtí a tým umožní ich presnejšie počítanie. Bunky sme počítali pri 100-násobnom zväčšení v troch paralelných vzorkách podľa vzorca (1).

$$\mathbf{b= n /(c * v * h) *x*r*f} \quad (1)$$

Premenné:
b – celkový počet buniek v 1 mm^3
n – celkový počet spočítaných buniek
c – počet štvorcov v ktorých sa počítalo
v – plocha počítaného štvorca
h – hĺbka komôrky
x – prepočet na 1 ml
f – riedenie formalínom
r – použité riedenie

1.3 Stanovenie fotosyntetických pigmentov

K zmrazenej bunkovej kultúre *E.gracilis* kultivovanej na svetle a v tme sme pridali 10 ml Cramer-Myersovho média a rozsuspendovali. K suspenzii sme pridali 80%-ný acetón v pomere 1:2 a intenzívne premiešali na stolovej trepačke približne 2 minúty. Koncentráciu fotosyntetických pigmentov sme stanovili spektrofotometricky pri troch vlnových dĺžkach 470 nm, 645 nm a 665 nm [4].

Výslednú koncentráciu chlorofylu *a* sme vypočítali dosadením získaných absorbancií do vzorca (2).

$$\boldsymbol{Chl\ a} = \frac{[\mathbf{11,75} * (\boldsymbol{A}\,\mathbf{662}) - \mathbf{2,35} * (\boldsymbol{A}\,\mathbf{645})]}{\mathbf{1000}}$$

(2), [4]

Výslednú koncentráciu chlorofylu *b* sme vypočítali dosadením získaných absorbancií do vzorca (3).

$$\boldsymbol{Chl\ b} = \frac{[\mathbf{18,61} * (\boldsymbol{A}\,\mathbf{645}) - \mathbf{3,96} * (\boldsymbol{A}\,\mathbf{662})]}{\mathbf{1000}}$$

(3), [4]

Celkový chlorofyl sme vypočítali dosadením hodnôt do vzorca (4).

$$\boldsymbol{Total\ Chl} = \boldsymbol{Chl\ a} + \boldsymbol{Chl\ b}$$

(4), [4]

Výslednú koncentráciu karotenoidov sme vypočítali dosadením získaných absorbancií do vzorca (5).

$$Car = \frac{[1000 * (A470) - 227 * Chla - (\frac{81,4 * Chlb}{227})]}{1000}$$

(5), [4]

1.4 Stanovenie obsahu prolínu

K zmrazenej bunkovej kultúre *E.gracilis* kultivovanej v rôznych kultivačných podmienkach sme pridali 95%-ný etanol a dôkladne zhomogenizovali v trecej miske. Vzniknutú zmes sme prepipetovali do centrifugačných skúmaviek. Pracovali sme v triplikáte. Po centrifugácii 10 minút pri 4000 rpm a pri laboratórnej teplote, sme k 1ml supernatantu pridali reakčnú zmes obsahujúcu (1 % (w/v) ninhydrín, 20 % (v/v) etanol a 60 % (v/v) kyselinu octovú) v pomere 1:1. Následne sme vzorky približne 1 minútu intenzívne premiešali na stolovej trepačke a inkubovali pri teplote 95°C 20 minút. Po inkubácii sme meraním absorbancie pri 520 nm spektrofotometricky stanovili obsah prolínu na základe kalibračnej krivky [15].

1.5 Extrakcia proteínov

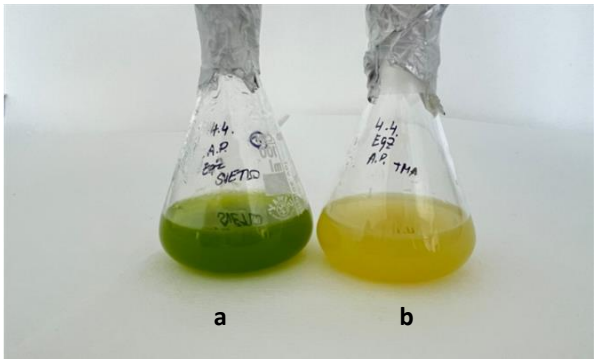
Extrakciu proteínov z buniek *E.gracilis* sme vykonali podľa Hajduch a kol. [14]. Teplotu počas extrakcie proteínov sme udržiavali pod 4°C ako preventívne opatrenie proti proteázovej aktivite. Bunky *E.gracilis* sme zhomogenizovali v trecej miske s tekutým dusíkom a rozsuspendovali v extrakčnom tlmivom roztoku (pH 8,8), ktorý pozostával z 5 ml extrakčného roztoku (0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,9 M sacharóza) 5 ml fenolu a 20 µl β- ME. Po rozmrazení sme vzniknutú zmes nechali 30 minút miešať na výkyvnej trepačke pri teplote 4 °C. Po centrifugácii 15 min., 6000 rpm a 4 °C sa zmes rozdelila na vrchnú fenolovú a spodnú vodnú fázu. Odpipetovali sme vrchnú fenolovú fázu ku ktorej sme pridali 5-násobný objem zrážacieho roztoku (0,1M octan amónny v 100 % metanole) a nechali zrážať cez noc v mrazničke pri teplote -18 °C. Vyzrážané proteíny sme oddelili od zmesi centrifugáciou 20 min., pri 4000 rpm a 4 °C. Vzniknutý pelet sme 2-krát premyli ľadovo vyhladeným 0,1M octanom amónnym v 100 % metanole, 2-krát ľadovo vychladeným 80 % acetónom a 1-krát vyhladeným 70 % etanolom. Medzi každým premývaním sme pelet úplne rozsuspendovali.

1.6 Štiepenie proteínov a MS analýza

Štiepenie proteínov trypsínom v roztoku sme vykonali podľa Hughes a kol. [16]. Následná kvapalinová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou a bioinformatickým spracovaním výsledkov bola vykonaná podľa Škodová-Sveráková a kol. [17].

2 Výsledky a diskusia

Rast buniek *E.gracilis* sme pozorovali aj v kultúrach, ktoré sme kultivovali bez prístupu svetla. Bunky *E.gracilis* kultivované na svetle vykazovali typické zelené sfarbenie (Obr. 1a) pričom bunky *E.gracilis* kultivované v tme boli svetlé, bez výrazného zeleného sfarbenia (Obr. 1b). Teplota, pH, svetlo, kvalita a kvantita živín, sú hlavné faktory, ktoré ovplyvňujú účinnosť fotosyntézy a rýchlosť rastu.

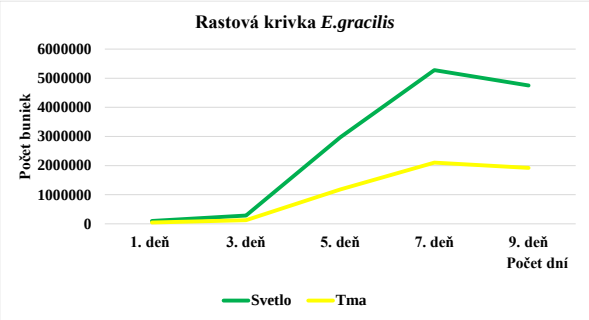


Obr. 1: Kultúry buniek *E.gracilis* kultivované na svetle (a) a v tme (b).

Svetlo predstavuje primárny zdroj energie pre proces fotosyntézy, pri ktorej dochádza k premene oxidu uhličitého na organické látky, pričom sa uvoľňuje kyslík ako sekundárny produkt. Zelené mikroriasy absorbujú svetelnú energiu prostredníctvom hlavného pigmentu – chlorofylu, ktorý je schopný absorbovať svetelnú energiu, ktorá je nevyhnutná pri procese fotosyntézy v rozsahu 450-475 nm a 630-675 nm. V rôznych kultivačných podmienkach vykazuje *E.gracilis* odlišné stupne získavania svetla a fotosyntézy, čo súvisí s jej metabolickou dráhou. Euglena pestovaná na svetle vykazuje vysokú hladinu pyruvátu a nízku hladinu UAP-glukózy, glycerátu 1-3-bifosfátu, 2-fosfoglycerátu a adenozíntrisfosfátu v porovnaní s *E.gracilis* kultivovanou v tme. Zeng a kol. [5] uviedli, že Euglena kultivovaná za svetelných podmienok (mixotrofia) rastie oveľa rýchlejšie ako v tme (heterotrofia) [1]. V mixotrofných podmienkach je rýchlosť rastu vyššia v porovnaní s autotrofnými podmienkami v dôsledku obmedzeného množstvo CO_2. Dôvodom je, že pri mnohých jednobunkových fotosyntetických kultúrach dochádza k deleniu buniek v tme [6].

Na základe pravidelného počítanie buniek *E.gracilis* kultivovaných na svetle a v tme (Obr. 2) sme

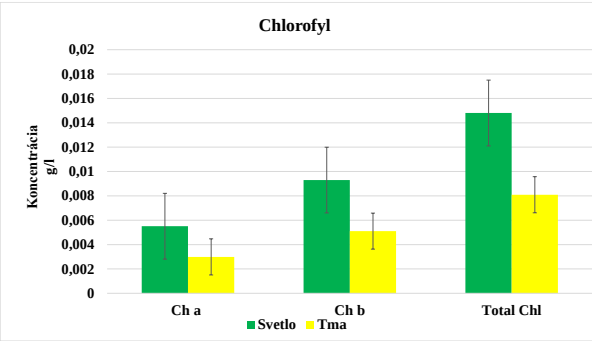
prostredníctvom počítačového programu Microsoft Excel zostrojili rastové krivky. Dosadením hodnôt do príslušného vzorca sme vypočítali priemerný počet buniek v 1 ml bunkovej kultúry. Závislosť počtu buniek od časového intervalu, počas ktorého sme kultúry buniek *E.gracilis* kultivovali, sme zobrazili graficky. Rastová krivka zobrazuje priebeh rastu bunkovej populácie v niekoľkých fázach: lag fáza, fáza zrýchleného rastu a exponenciálna fáza, ktoré sú viditeľné na oboch rastových krivkách.



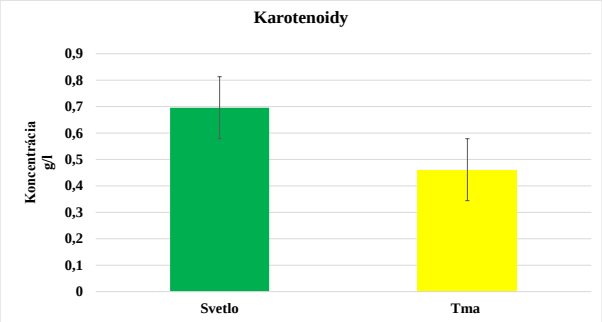
Obr. 2: Rastová krivka kultúr *E.gracilis* kultivovaných na svetle (zelená) a v tme (žltá).

Na Obr. 2 je znázornený nárast buniek počas jednotlivých dní kultivácie. Prvé dni kultivácie (1-3.deň) prebiehala lag fáza, kedy dochádza ku syntéze zásobných látok a látok potrebných pre delenie buniek. Na štvrtý a piaty deň od kultivácie nastal exponenciálny nárast buniek, kedy sa bunky intenzívne delili. Na 7 deň kultivácie bol najvyšší počet buniek v kultúre. Pre bunky *E.gracilis* kultivované na svetle bol priemerný počet buniek na 7.deň 5.10^6 buniek/ml. Pre bunkové kultúry *E.gracilis* kultivované v tme bol priemerný počet buniek na 7.deň 2.10^6 buniek/ml. Po stacionárnej fáze nastala fáza odumierania, kde počet buniek začal klesať.

Na základe biochemickej analýzy stanovenia fotosyntetických pigmentov v bunkách *E.gracilis* (Obr. 3 a Obr. 4) sme zistili, že v bunkách kultivovaných v tme došlo k výraznému štatistickému poklesu koncentrácie celkového chlorofylu, chlorofylov *a, b* a neposlednom rade aj karotenoidov v porovnaní s bunkami *E.gracilis* kultivovanými na svetle. Pri kultivácii na svetle bola najvyššia koncentrácie chlorofylu *a* (*Chl a*) 0,0055 g/l, chlorofylu *b* (*Chl b*) 0,0093 g/l, celkového chlorofylu (*total Chl)* 0,015 g/l a karotenoidu (*car*) 0,70 g/l. *Chl a* bol znížený 1,84-násobne, *Chl b* bol znížený 1,82-násobne, *total Chl* bol znížený 1,82-násobne a *car* boli znížené 1,5-násobne v stresovaných bunkách *E.gracilis*, resp. kultivovaných v tme v porovnaní s bunkami kultivovanými na svetle ako kontrola.



Obr. 3: Stanovenie koncentrácie chlorofylov v bunkách *E.gracilis* kultivovaných na svetle (zelený stĺpec) a v tme (žltý stĺpec)

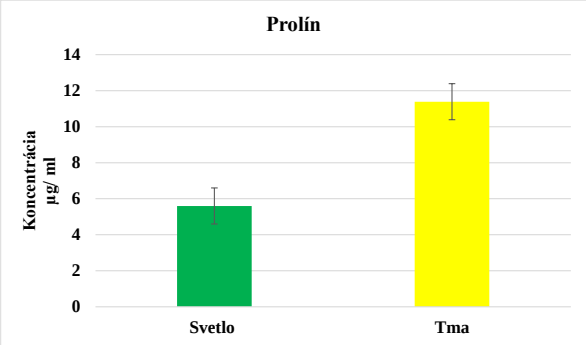


Obr. 4: Stanovenie množstva karotenoidov v bunkách *E.gracilis* kultivovaných na svetle (zelený stĺpec) a v tme (žltý stĺpec).

Fotosyntetické pigmenty sú nevyhnutné zlúčeniny na absorbovanie a premenu energie vo fototrofných orgánoch. Pre vyvážený energetický stav a dobrú vitalitu fototrofov je potrebné optimálne množstvo týchto pigmentov v tylakoidovej membráne. Akýkoľvek environmentálny stres, v našom prípade abiotický stresový faktor – kultivácia v tme ovplyvnila účinnosť fotosyntézy a tým pádom aj prežitie buniek. Azizullah a kol. [7] uviedli, že chlorofyl *b* je v *E.gracilis* odolnejší voči environmentálnym stresorom v porovnaní s chlorofylom *a* a karotenoidmi.

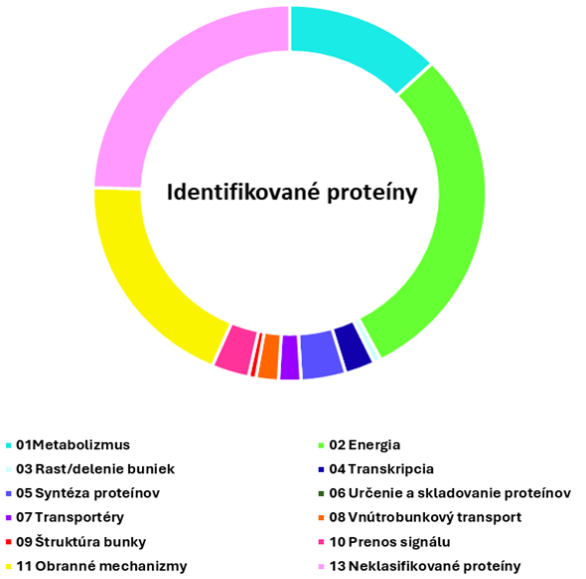
Abiotický stresový faktor, kultivácia v tme, môže mať vplyv na množstvo prolínu u *E.gracilis.* Prolín je aminokyselina, ktorej množstvo sa môže zvyšovať ako odpoveď na stresové podmienky. Na základe biochemickej analýzy sme stanovili obsah prolínu v bunkách kultivovaných na svetle a v tme. Syntéza prolínu je spájaná s environmentálnym stresom, čo potvrdzuje aj náš experiment, kedy sme pozorovali nárast obsahu prolínu v stresovaných kultúrach –

kultivovaných v tme vporovnaní s kultúrami kultivovanými na svetle (Obr. 5). Podľa kalibračnej krivky sme vypočítali koncentrácie prolínu v bunkách kultivovaných na svetle a v tme. V prípade kultivácie na svetle bola najvyššia koncentrácie prolínu 5,6 µg/ml a v prípade kultivácie v tme 11,39 µg/ml. V dôsledku zmenených kultivačných podmienok došlo ku 2,03-násobnému zvýšeniu prolínu v bunkách kultivovaných v tme v porovnaní s kontrolou – bunkami kultivovanými na svetle.



Obr. 5: Stanovenie obsahu prolínu v bunkách *E.gracilis* kultivovaných na svetle (zelený stĺpec) a v tme (žltý stĺpec).

Po extrakcii proteínov sme štiepili proteíny trypsínom v roztoku metódou podľa Hughes a kol. [16]. Následne sme podľa Škodová-Sveráková a kol. [17] vykonali MS analýzu, ktorou sme identifikovali 163 proteínov, ktoré sme zatriedili do 12 funkčných skupín podľa Bevana a kol. [13] (Obr. 6).



Obr. 6: Graf znázorňujúci rozdelenie identifikovaných proteínov do 12 funkčných skupín podľa Bevana a kol. [13].

Najviac proteínov ktoré sme identifikovali v tme, patria do skupiny metabolizmus a energia. Podľa získaných údajov predpokladáme, že kultivácia v tme si vyžaduje zvýšené nároky na energiu. Ďalšia najzastúpenejšia skupina bola obranný mechanizmus.

Záver

Euglena gracilis môže rásť pri autotrofných aj heterotrofných podmienkach. Vzhľadom na jednoduchú kultiváciu a veľké bunky sa *E.gracilis* využíva na štúdium chloroplastov, fotosyntézy a endosymbiózy, čo ju robí ideálnym modelovým organizmom, preto je vhodná na realizáciu rôznych experimentov. Náš experiment spočíval v použití kultivácie buniek *E.gracilis* v Cramer-Myersovom médiu, ktoré je vďaka svojmu neutrálnemu pH vhodné na experimentálne účely. Rast buniek *E.gracilis* bol zaznamenaný v obidvoch kultivačných podmienkach, na svetle aj v tme. Rozdiel bol viditeľný už pri prvotných pozorovaniach, po 7. dňoch kultivácie, kultúry kultivované v tme boli výrazne svetlejšie. Pravidelným počítaním buniek a následným zostavením rastových kriviek sme zistili, že počet buniek od naočkovania kultúry stúpal a vyšší počet buniek bol pri kultivácii na svetle v porovnaní s kultiváciou v tme. Stanovili sme fotosyntetické pigmenty, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu pri asimilácii dusíka a pri zbieraní svetla. Pri abiotickom strese vyvolanom kultiváciou v tme došlo ku štatistickému poklesu koncentrácie celkového chlorofylu, chlorofylov *a, b* a neposlednom rade aj karotenoidov v porovnaní s bunkami *E.gracilis* kultivovanými na svetle. Chlorofyl *a* bol znížený 1,84-násobne, chlorofyl *b* bol znížený 1,82-násobne, celkový chlorofyl bol znížený 1,82-násobne a karotenoidy boli znížené 1,5-násobne v stresovaných bunkách *E.gracilis*, resp. kultivovaných v tme v porovnaní s bunkami kultivovanými na svetle. Syntéza prolínu je spájaná s environmentálnym stresom, čo potvrdzuje aj náš experiment, kedy sme pozorovali nárast obsahu prolínu v stresovaných kultúrach kultivovaných v tme v porovnaní s kontrolou. V prípade kultivácie na svetle bola najvyššia v tme 11,39 µg/ml. V dôsledku zmenených kultivačných podmienok došlo ku 2,03-násobnému zvýšeniu prolínu v bunkách kultivovaných v tme v porovnaní s kontrolou. Prostredníctvom MS a bioinformačných nástrojov sme identifikovali 163 proteínov, zatriedili sme ich do 12 funkčných skupín podľa Bevana a kol. [13]. Najviac zastúpené skupiny proteínov patria do kategórie metabolizmus a energia. Ďalšia najzastúpenejšia skupina bola obranný mechanizmus.

Poďakovanie
Ďakujem Dr. Maksymovi Danchenkovi za MS analýzy.
Práca bola podporená projektom VEGA - 1/0694/21.

Použitá literatúra

[1] GU, G. a kol., 2022. Metabolomics revealed the photosynthetic performance and metabolomic characteristics of Euglena gracilis under autotrophic and mixotrophic conditions. In World Journal of Microbiology and Biotechnology [online]. 2022, roč. 38, č. 9, s. 1–13 [cit. 27.02.2024]. ISSN 15730972. Dostupné na: doi:10.1007/S11274-022-03346-W/FIGURES/6

[2] HASAN, M. a kol., 2019. Comparative proteomics investigation of central carbon metabolism in Euglena gracilis grown under predominantly phototrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivations. In Algal Research, ISSN 2211- 9264. 2019, roč. 43, s. 101638.

[3] CRAMER, M. – MYERS, J. 1952. Growth and photosynthetic characteristics of Euglena gracilis. In Archives of Microbiology, ISSN 1432-072X, 1952, roč. 17, č. 1, s. 384-402.

[4] TIMOTIUS, V. a kol., 2022. The content of lipid, chlorophyll, and carotenoid of Euglena sp. under various salinities. AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol [online]. 2022, roč. 30, č. 3, s. 114–122.

[5] ZENG, M. a kol., 2016. Fatty acid and metabolomic profiling approaches differentiate heterotrophic and mixotrophic culture conditions in a microalgal food supplement "Euglena". In BMC Biotechnology [online]. 2016, roč. 16, č. 1, s. 1–8 [cit. 27.02.2024]. ISSN 14726750. Dostupné na: doi:10.1186/S12896-016-0279-4/FIGURES/5

[6] INWONGWAN, S. a kol., 2019. Euglena Central Metabolic Pathways and Their Subcellular Locations. In Metabolites [online]. 2019, roč. 9, č. 6 [cit. 27.02.2024]. ISSN 22181989. Dostupné na: doi:10.3390/METABO9060115

[7] AZIZULLAH, A. a kol.,2014. Photosynthesis and photosynthetic pigments in the flagellate Euglena gracilis – As sensitive endpoints for toxicity evaluation of liquid detergents. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology [online]. 2014, roč. 133, s. 18–26 [cit. 27.02.2024]. ISSN 1011-1344. Dostupné na: doi:10.1016/J.JPHOTOBIOL.2014.02.011

[8] Erickson, E., Wakao, S., & Niyogi, K. K. (2015). Light stress and photoprotection in Chlamydomonas reinhardtii. The Plant Journal, roč. 82, č. 3, s. 449–465. https://doi.org/10.1111/TPJ.12825

[9] KOH, H. G. a kol., 2019.Heterologous synthesis of chlorophyll b in Nannochloropsis salina enhances growth and lipid production by increasing photosynthetic efficiency. Biotechnology for Biofuels, roč. 12, č. 1, s. 1–15. Dostupné na: https://doi.org/10.1186/S13068-019-14623/FIGURES/6

[10] MALTSEV, Y. a kol., 2021. Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. Biology 2021, roč. 10, č. 10, s. 1060, Dostupné na: https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10101060

[11] WONG, Y. a kol., 2016. Effects of Light Intensity, Illumination Cycles on Microalgae Haematococcus Pluvialis for Production of Astaxanthin Journal of Marine Biology and Aquaculture. Dostupné na: https://doi.org/10.15436/2381-0750.16.1083

[12] HAYAT S, a kol., 2012. Role of proline under changing environments: a review. Plant Signal Behav 7:1456–1466.

[13] BEVAN, M a kol. 1998. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. In Nature, roč. 391, s. 485-488. ISSN 1476-4687.

[14] HAJDUCH, M. a kol., 2005. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution twodimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. In Plant physiology, ISSN 1532-2548. 2005, roč. 137, č. 4, s. 1397-1419.

[15] AHMED, Hoda – HÄDER, Donat Peter. 2010. Rapid ecotoxicological bioassay of nickel and cadmium using motility and photosynthetic parameters of Euglena gracilis. In Environmental and Experimental Botany, roč. 69, č. 1, s. 68-75. ISSN 0098-8472

[16] HUGHES, C. S. a kol., 2019. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nature protocols*, roč. *14*, č. 1, s. 68-85.

[17] ŠKODOVÁ-SVERÁKOVÁ, I. a kol. 2021. Highly flexible metabolism of the marine euglenozoan protist Diplonema papillatum. BMC biology, roč. 19, č. 1, s. 1-21, ISSN: 1741-7007.

Indukcia kalusových kultúr z koreňových segmentov durmanu obyčajného (*Datura stramonium* L.)

Callus induction from root segments of thornapple (*Datura stramonium* L.)

Jennifer Scherrens[1] – Šarlota Kaňuková[1,2] –Ján Kraic[1,2]
Školiteľ: Ján Kraic[1,2]
[1]Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava,
[2]Výskumný ústav rastlinnej výroby, NPPC, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany
[1]scherrens1@ucm.sk, [1]sarlota.kanukova@ucm.sk, [1,2]jan.kraic@ucm.sk

Abstrakt
Žiadanými sekundárnymi metabolitmi z viacerých rastlinných druhov, medzi ktoré patrí aj durman obyčajný (*Datura stramonium* L.), sú tropánové alkaloidov. Jedným z nich je aj hyoscyamín (respektíve jeho optický izomér atropín) a skopolamín. Alternatívou k pestovaniu durmanu obyčajného je produkcia jeho rastlinnej biomasy a týchto alkaloidov v *in vitro* kultúrach. Vhodnými sú kalusové kultúry, bunkové suspenzné kultúry, tzv. „hairy root" kultúry a kultúry adventívnych koreňov. Môžu byť uzavretými produkčnými systémami, s vyššími výťažkami biomasy a metabolitov a nezávislými od vonkajších pestovateľských podmienok. Táto práca cielila k možnosti založenia kalusovej kultúry *in vitro* odvodenej zo segmentov koreňa durmanu obyčajného a nárastu hmotnosti kalusovej biomasy, s využitím rastlinných rastových regulátorov. Bunková biomasa kalusov by mala byť schopná syntetizovať oba žiadané sekundárne metabolity (hyoscyamín a skopolamín).
Kľúčové slová: *Datura stramonium* L., durman obyčajný, kalus, rastové regulátory

Abstract
Desired secondary metabolites from several plant species, including *Datura stramonium* L. (thornapple), are tropane alkaloids, hyoscyamine (its optical isomer atropine, respectively) and scopolamine between them. An alternative to the cultivation of thornapple in soil is the production of its plant biomass and both alkaloids using *in vitro* cultures. Suitable ones are callus cultures, cell suspension cultures, so-called "hairy root" cultures, and adventitious root cultures. They are closed production systems *in vitro*, with possible higher yields of biomass as well as metabolites, independent of environmental growing conditions. This work aimed to establish callus culture *in vitro* derived from segments of the root of the thornapple and continual increasing the weight of the callus biomass with the use of plant growth regulators. The cellular biomass of the callus should be able to synthesize both desired secondary metabolites, hyoscyamine and scopolamine.
Key Words: *Datura stramonium* L., thornapple, callus, growth regulators

Úvod

Rastliny a ich metabolity vykazujú významný potenciál pre aplikácie v zdravotníctve, farmácií, potravinárstve a iných odvetviach priemyslu. Neustále stúpajúci dopyt po prírodných zložkách smeruje k vyššej produkcii rastlín a ich metabolitov. Rastliny rodu *Datura* sa prirodzene vyskytujú v tropických oblastiach, ale v súčasnosti sú rozšírenie už aj oblastiach mierneho podnebného pásma. Rovnako ako väčšina druhov rastlín z čeľade *Solanaceae* je aj tento rod bohatým zdrojom fytochemikálií zo skupín fenolov, steroidov, acylsacharidov, amidov a ďalších. O všetkých členoch rodu *Datura* je známe, že sú bohaté na tropánové alkaloidy [1], ktoré dávajú potenciál na využitie rastlín tohto rodu. Najviac zastúpeným druhom v tomto rode, aj v miernom podnebnom pásme, je durman obyčajný (*Datura stramonium* L.). Predstavuje významný zdroj tropánových alkaloidov, najmä hyoscyamínu (atropínu) a skopolamínu. Tie majú farmakologické účinky, ale zaujímavé sú aj ich insekticídne, herbicídne, fungicídne, antibakteriálne a ďalšie účinky [2]. K syntéza alkaloidov dochádza hlavne v koreňoch mladých rastlín [3]. Vzhľadom na svoje charakteristiky je však pestovanie durmanu obyčajného problematické. Techniky kultivácie rastlinných pletív a orgánov *in vitro* sa ukázali ako dôležité nástroje nielen pri objasňovaní biosyntetických dráh sekundárnych metabolitov, ale aj ich produkcii *in vitro* a dajú sa použiť aj ako alternatívny systém na produkciu tropánových alkaloidov durmanu obyčajného. Využívať sa dajú kalusové kultúry, bunkové suspenzné kultúry, a koreňové kultúry. Tie buď vo

forme kultúry netransgénnych koreňových kultúr a kultúr adventívnych koreňov, alebo transgénne tzv. „hairy roots“ kultúry. Málo pozornosti sa doteraz venovalo produkcii alkaloidov v kalusoch durmanu obyčajného. Len ojedinelé práce [4] sa venujú tejto problematike. Cieľom tejto práce preto bolo založiť kalusové kultúry *in vitro* zo segmentov koreňa durmanu obyčajného a kultivovať ich dlhodobo s cieľom nárastu hmotnosti kalusovej biomasy. Tá by mala byť zdrojom pre extrakciu tropánových alkaloidov hyoscyamínu a skopolamínu.

1 Materiál a metódy

V tejto kapitole si popíšeme použité rastlinné materiály ako aj jeho prípravu a použité metódy, ktoré sme využili pri výskume.

1.1 Príprava rastlinného materiálu

Semená durmanu obyčajného (*D. stramonium* L.) boli získané od spoločnosti SemenaOnline s.r.o. (Praha, Česká republika). Pred klíčením boli semená skarifikované 20 minút v koncentrovanej kyseline sírovej. Následne boli niekoľkokrát premyté v tečúcej vode. Povrchová sterilizácia semien bola vykonaná opláchnutím v 96 % (v/v) etanole, počas 30 s a pôsobením 4,7 % (v/v) chlórnanu sodného (v komerčnom prípravku Savo (Tatrachema, v.d., Slovenská republika) počas 15 min. Semená boli po premytí v sterilnej vode a po osušení uložené na kultivačné médium ½MS (médium Murashige a Skoog) [5] s polovičným obsahom všetkých zložiek, vrátane vitamínov, sacharózou (3 %; w/v) a agarom (0,8 %; w/v), pH 5,7 – 5,8. Kultivácia semien prebiehala v *in vitro* kultúre pri teplote 23 ± 2 °C a fotoperióde 16 h svetlo/8 h tma.

1.2 Indukcia kalogenézy

Kultivačné médium na indukciu kalogenézy bolo MS [5] s plným obsahom zložiek, so sacharózou (3 %; w/v), agarom (0,8 %; w/v), pH 5,7–5,8, a pridanými kombináciami auxínov (kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová 2,4-D a kyselina 1-naftyloctová NAA) a cytokinínov (kinetín KIN, 6-γ,γ-dimetylallylaminopurín 2iP a thidiazuron TDZ) (Tab. 1) v pomere 1 : 0,25 (2 mg/l : 0,5 mg/l). Kontrolným bolo MS s vitamínmi bez rastových regulátorov.

Explantátom použitým na indukciu kalogenézy a získanie kalusových kultúr boli segmenty koreňa z durmanu obyčajného s dĺžkou ±0,9 cm. Kultivácia prebiehala pri teplote 23±2 °C a fotoperióde 16 h svetlo/8 h tma. Po 4, 8 a 12 týždňoch boli kalusy prenášané na čerstvé kultivačné médium s rovnakými kombináciami auxínov a cytokinínov.

Tab. 1 Kombinácie rastových regulátorov pre indukciu kalogenézy z koreňových segmentov.

Označenie	Auxín (2 mg/l)	Cytokinín (0,5 mg/l)
1	2,4-D	KIN
2	2,4-D	2iP
3	2,4-D	TDZ
4	NAA	KIN
5	NAA	2iP
6	NAA	TDZ
7	-	-

Vyhodnocovanie kalogenézy bolo vykonávané počas pasážovania kalusov na čerstvé kultivačné médiá, teda po 4, 8 a 12 týždňoch kultivácie. Sledovaná bola frekvencia indukcie kalusov (po prvých 4 týždňoch kultivácie) a ich morfologické charakteristiky. Po každom pasážovaní (po 4., 8. a 12. týždni kultivácie) bola hodnotená dynamika nárastu čerstvej hmotnosti kalusovej biomasy (ako priemerné hodnoty so smerodajnými odchýlkami) Použitím softvérmi boli Microsoft® Excel® pre Microsoft 365 MSO verzia 2304 a Statgraphic verzie 19.2.01 (Statgraphic Technologies, Inc., The Plains, VA, USA).

2 Výsledky a diskusia

V tejto kapitole si podrobne vyhodnotíme dosiahnuté výsledky a porovnáme ich so stanoveným cieľom.

2.1 Výsledky indukcia kalogenézy

Celková frekvencia indukcie kalusu na 150 koreňových segmentoch, po prvých 4 týždňoch kultivácie, bola 99,33 %. Kalusy sa na segmentoch koreňa indukovali na MS médiu so všetkými kombináciami auxínov a cytokinínov (Tab. 1). Na koreňových segmentoch kultivovaných na MS médiu bez rastových regulátorov (negatívna kontrola, kombinácia č. 7 v Tab. 1) kalogenéza nebola indukovaná. Na niektorých kombináciách rastových regulátorov v MS médiu z explantátov regenerovali ďalšie početné korienky, boli bez znakov nekrotizovania, aj po 3 mesiacoch kultivácie *in vitro*. Indukcia kalogenézy, tak ako býva časté, bol proces bezproblémový.

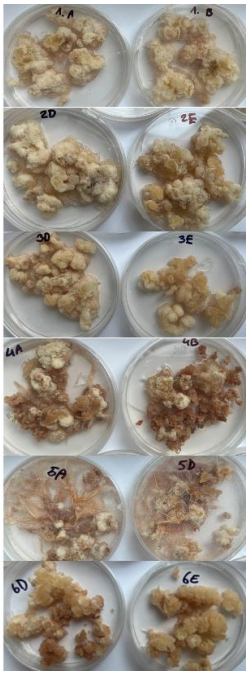
2.2 Morfologické charakteristiky kalusov

Kalusy indukované po prvých 4 týždňoch mali na všetkých kombináciách rastových regulátorov, okrem jednej, pevnú a kompaktnú štruktúru. Výnimkou bola kombinácia rastových regulátorov NAA + KIN, na ktorej boli kalusy mäkké a rozpadavé, hnedo sfarbené. Kalusy sa po 4 týždňoch intenzívneho rastu rozrástli až do rozmerov s priemerom ±2 cm.

Zafarbenie kalusov bolo prevažne krémovo-bielo-zelené, pričom sa kalusy farebne mierne odlišovali v závislosti od kombinácií rastových regulátorov v médiu. Nežiadúca regenerácia nových koreňov, bola najlepšie potlačená na MS médiu s kombináciou rastových regulátorov 2,4-D + TDZ, na ktorej bol pozorovaný iba jediný novoregenerovaný koreň. Pri ostatných kombináciách regulátorov sa objavil najmenej jeden regenerovaný koreň.

Po 8 týždňoch kultivácie sa kalusy vo svojej štruktúre výrazne neodlišovali, naďalej zostali pevné a kompaktné. Na kombinácii rastových regulátorov NAA + KIN boli kalusy zhnednuté, zostali mäkké a rozpadavé. Ostatné kalusy sa sfarbili mierne do hnedo-žltej farby, pričom na povrch kalusu zostávala vrstva bielych buniek. Kalusy zväčšili svoje objemy, niektoré až do veľkosti s priemerom 3-4 cm.

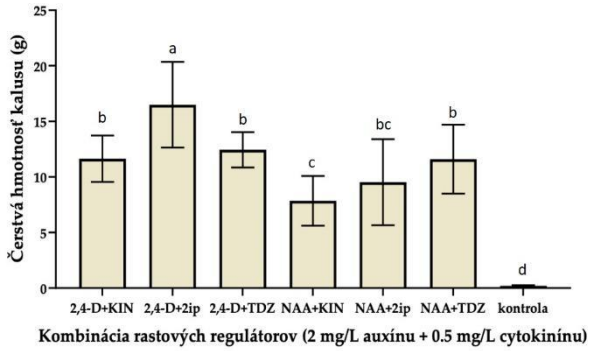
Po 12 týždňoch kultivácie bola štruktúra kalusov pevná a kompaktná (Obr. 1), s výnimku kombinácií NAA + KIN a NAA + TDZ, na ktorých už dominoval mäkký, rozpadavý a hnedo sfarbený kalus. Sfarbenie ostatných kalusov sa nemenilo. Kalusy výrazne zväčšili svoje objemy. Nové korene neboli vôbec prítomné na kombinácii 2,4-D + TDZ. Na kombinácií 2,4-D + 2iP bol pozorovaný už iba jeden novoregenerovaný koreň.



Obr. 1 Kalusy durmanu obyčajného po 12 týždňoch kultivácie na MS médiu s rôznymi kombináciami rastových regulátorov (označených 1-6, Tab. 1).

2.3 Dynamika rastu kalusov

Čerstvá hmotnosť kalusovej biomasy indukovanej z koreňových segmentov narastala počas celých 12 týždňov kultivácie. Rozdiely boli spôsobené rôznou kombináciou rastových regulátorov v MS médiu (Obr. 1). Najnižšie hodnoty čerstvej hmotnosti kalusovej biomasy boli zaznamenané pri kombináciách NAA + KIN a NAA + 2iP. Priemerná hodnota čerstvej hmotnosti kalusov nepresiahla hodnotu 10 g. Porovnateľné hodnoty (±12 g) čerstvej hmotnosti kalusovej biomasy sa dosiahli na 3 kombináciách rastových regulátorov: NAA + TZD, 2,4-D + KIN a 2,4-D + TDZ. Najvyššie hodnoty čerstvej hmotnosti boli na kombináciách auxínu 2,4-D s cytokinínom 2iP (Graf 1).



Graf 1. Vplyv rastových regulátorov na čerstvú hmotnosť biomasy kalusov (g) indukovaných z

koreňových segmentov durmanu obyčajného po 12 týždňoch kultivácie (koeficienty a-d vyjadrujú štatisticky významné rozdiely medzi hodnotami čerstvej hmotnosti kalusu, $p<0.05$).

Priemerná čerstvá hmotnosť kalusovej biomasy tu po 12 týždňoch kultivácie dosiahla hodnotu 16,50 ± 3,85 g. Bola 1,3-násobne vyššia ako na druhej najlepšej kombinácií (2,4-D + TDZ). Kombinácia 2,4-D + 2iP bola vhodná aj z pohľadu absencie regenerácie nových koreňov. Možno konštatovať, že vyššie hodnoty čerstvej hmotnosti kalusov boli získané na MS médiách s kombináciami 2,4-D so všetkými 3 cytokinínmi (2iP, KIN, TDZ). Výsledky indukcie kalusových kultúr sú v súlade s výsledkami, ktoré uskutočnili Miskat a kol [6] z rôznych explantátov *Datura metel* L.. Uviedli, že internodálny segment vykazoval najlepšiu a najrýchlejšiu indukciu kalusov v médiu MS doplnenom o 2 mg/l 2,4-D. Rovnaké výsledky zaznamenali aj Siddiqui a kol. [7], ktorí z 15 kombinácií vyčlenili ako najvhodnejšie, z hľadiska maximálnej kalogenézy listových segmentov *Datura innoxia,* MS médium doplnené o 2 mg/l 2,4-D. Amiri a kol. [8] uviedli ako najúčinnejšie pre indukciu kalusu z listových explantátov a z embryí *Datura stramonium* regulátory 2,4-D (2 mg/l) s KIN (0,5 mg/l) a 2 mg/l samotnú 2,4-D.

Záver

Indukcia kalusov z koreňových segmentov durmanu obyčajného bola úspešná na všetkých použitých kombináciách rastových regulátorov v MS médiu. Morfologické parametre kalusov na všetkých použitých kombináciách rastových regulátorov boli veľmi podobné. Čerstvá hmotnosť narastajúcej kalusovej biomasy bola ovplyvnená kombináciami rastových regulátorov. Najvyšší nárast bol s použitím kombinácie 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2iP. Po 12 týždňoch dosiahla priemerná čerstvá hmotnosť kalusov na tejto kombinácií až 16,50±3,85 g. Pre nárast kalusovej biomasy v čase mala výrazne lepší vplyv 2,4-D v porovnaní s NAA. Možnosť dlhodobo udržiavať kalusovú kultúru durmanu obyčajného vo vitálnom stave (zachované morfologické parametre a kontinuálny rast kalusovej biomasy) dáva predpoklad na založenie bunkových suspenzných kultúr. V oboch týchto typoch kultúr je predpoklad na efektívnu biotechnologickú produkciu žiadaných sekundárnych metabolitov hyoscyamínu a skopolamínu v uzavretých *in vitro* systémoch.

Poďakovanie

Práca vznikla s podporou Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch projektu FPPV-05-2024 ,,Zavedenie účinného *in vitro* produkčného systému durmanu obyčajného a sledovanie vplyvu rastlinných vírusov na produkciu tropánových alkaloidov“ podporeného z Fondu na podporu výskumu na Univerzite sv. Cyrila a Metoda v Trnave (Plán obnovy a odolnosti).

Použitá literatúra

[1] CINELLI, M.A., JONES, A.D., 2021. Alkaloids of the genus *Datura*: Review of a rich resource for natural product discovery. In Molecules, ISSN 1420-3049, 2021, roč. 26, s. 2629.

[2] AL-SNAFI, A.E., 2017. Medical importance of *Datura fastuosa* (syn: *Datura metel*) and *Datura stramonium*—A review. In IOSR Journal of Pharmacy, ISSN 2250-3013, 2017, roč. 7, s. 43–58

[3] MIRALDI, E. a kol., 2001. Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. In Fitoterapia, ISSN 1873-6971, 2001, roč. 72, s. 644-648.

[4] RAHMAN, R.A. a kol. 2013. Effect of sodium chloride on tropane alkaloids accumulation and proline content in *Datura metel* and *D. stramonium* callus cultures. In International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, ISSN 2322-4827, 2013, roč. 1, s. 197-210.

[5] MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962. A Revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. In Physiologia Plantarum, ISSN 1399-3054, 1962, roč. 15, s. 473-497.

[6] MISKAT, A.J., HADIUZZAMAN, S., GHANI, M.A., 2003. Plant regeneration through calli derived from explants of in vitro grown seedlings of three forms of *Datura metel* L. In Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, ISSN 2224-7157, 2003, roč. 38, s. 81-90.

[7] SIDDIQUI, S., a kol., 2017. Comparative anylysis of hyoscine in wild-type and in vitro grown Datura innoxia by high performance liquid chromatography. In Tropical Journal of Pharmaceutical Research, ISSN 1596-9827, 2017, roč. 16, s. 1683-1692.

[8] AMIRI, S., a kol., 2011. In vitro propagation and whole plantr regeneration from callus in *Datura stramonium* L. In African Journal of Biotechnology, ISSN 1684-5315, 2011, roč. 10, s. 442-448.

Vplyv umelej infekcie ovsa siateho druhmi rodu *Fusarium* na obsah β-D-glukánu v zrnách

Influence of Artificial Infection of Oat with *Fusarium* Species on the Content of β-D-glucan in Grains

Žofia Škvareková[1], Michaela Havrlentová[2,3], Martina Hudcovicová[3], Lenka Klčová[3], Katarína Ondreičková[3], Svetlana Šliková[3]

Školiteľ: Michaela Havrlentová[2,3]

[1]Katedra botaniky a genetiky, FPVaI UKF, Nábrežie mládeže 91, 949 01 Nitra

[2]Oddelenie biotechnológií, ÚBB UCM, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava

[3]Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

[1]zofia.skvarekova@student.ukf.sk, [2]michaela.havrlentova@ucm.sk, [3]martina.hudcovicova@nppc.sk, [3]lenka.klcova@nppc.sk, [3]katarina.ondreickova@nppc.sk, [3]svetlana.slikova@nppc.sk

Abstrakt

Ovos siaty je čoraz viac uznávaný pre svoj nutričný a priemyselný význam. Spomedzi rôznych bioaktívnych zlúčenín v zrne je (1-3)(1-4)-β-D-glukán kľúčovou funkčnou zložkou, poskytujúcou priemyselné, nutričné a zdravotné výhody. Sú aj zmienky o tom, že metabolizmus tohto polysacharidu bunkovej steny je zodpovedný za reakcie rastliny na mierne formy stresu. Cieľom práce bolo sledovať vzťah medzi obsahom β-D-glukánu v zrne ovsa siateho a reakciou ovsa siateho na biotický stres. Päť odrôd ovsa siateho (*Avena sativa* L.) s rôznym obsahom β-D-glukánu sme podrobili umelej infekcii hubovými patogénmi *Fusarium graminearum* (FG) a *Fusarium culmorum* (FC) a sledovali sme zmeny v obsahu β-D-glukánu a množstvo patogénnej DNA v zrne ako prejav infekcie. Výsledky ukázali, že umelá infekcia spôsobila výrazný, štatisticky preukazný pokles v obsahu β-D-glukánu v plevnatých odrodách a mierny, nepreukazný pokles v nahých odrodách. Odrody Auron a Vaclav vykazovali preukazne menej β-D-glukánu aj patogénnej DNA po infekcii FC. V prípade infekcie FG sa v reakcii na patogén selektovala okrem odrôd Auron a Vaclav aj odroda Pushkinskij.

Kľúčové slová**:** ovos siaty, umelá infekcia*,* β-D-glukán, *Fusarium*, DNA

Abstract

Oats are increasingly recognized for their nutritional and industrial significance. Among various bioactive compounds in the oat grain, (1-3) (1-4)-β-D-glucan is a key functional component providing industrial, nutritional, and health advantages. Scientific literature suggests that the metabolism of this cell wall polysaccharide is responsible for the plant's response to mild forms of stress. The aim of this study was to investigate the correlation between the content of β-D-glucan in oat grain and its reaction to biotic stress. We exposed five oat varieties (*Avena sativa* L.) with different β-D-glucan content to an artificial infection caused by fungal pathogens *Fusarium graminearum* (FG) and *Fusarium culmorum* (FC), monitoring changes in β-D-glucan content and the presence of pathogenic DNA in the grain as a sign of infection. The results showed that the artificial infection caused a statistically significant decrease in the content of β-D-glucan in the hulled varieties and a slight, non-significant decrease in the naked varieties. Specifically, varieties Auron and Vaclav showed significantly less β-D-glucan and pathogenic DNA after FC infection. Furthermore, in response to FG infection, the Pushkinskij variety was selected in response to the pathogen, in addition to the Auron and Vaclav varieties.

Key Words: oat, artificial infection, β-D-glucan, *Fusarium*, DNA

Úvod

(1,3)(1,4)-β-D-glukán (β-D-glukán) je polysacharid zložený z monosacharidových jednotiek β-D-glukózy. Jeho výrazný výskyt v zrnách ovsa, obľúbenej plodine s minimálnymi nárokmi na poľnohospodárske vstupy a vysokou nutričnou hodnotou, je podporený jeho špeciálnou štruktúrou pod označením „zmiešaný glukán“ (MGL). Táto jedinečná štruktúra prispieva k výživovým výhodám ovsa a ovplyvňuje jeho rozpustnosť a viskozitu. β-D-glukán reguluje rovnováhu

glukózy v krvi, ovplyvňuje črevný mikrobióm, či posilňuje imunitný systém. V kontexte ľudskej výživy získava ovos na význame, a súhra medzi β-D-glukánom a vonkajšími faktormi, ako je patogénna invázia, sa stáva centrálnym bodom výskumu [1, 2].

Rod *Fusarium*, významná skupina rastlinných patogénov, značne ovplyvňuje pestovanie obilnín, predovšetkým ovsa. *Fusarium graminearum* (FG), celosvetovo prevládajúci druh, sa spolu s *Fusarium culmorum* (FC) dostáva do popredia v Európe ako najrozšírenejšie druhy infikujúce ovos. *Fusarium* spôsobuje komplexné problémy, vrátane chorôb od plesne mladých rastlín po hnilobu klasov. Fuzarióza klasov (FHB) je závažným ochorením obilnín, ktoré vedie k zníženej úrode a kontaminácii zŕn mykotoxínmi, ako sú deoxynivalenol (DON) a zearalenón (ZEN). Tieto mykotoxíny predstavujú hrozbu pre kvalitu a bezpečnosť ovsa ako primárneho zdroja potravy [3, 4].

Stres vyvolaný inváziou patogénov *Fusarium* spúšťa celý rad obranných mechanizmov, ktoré výrazne odhaľujú koncept „sladkej imunity“, ktorý je založený na metabolizme sacharidov a ich signalizačných funkciách a odhaľuje kľúčovú úlohu sacharidov, vrátane β-D-glukánu, pri zvyšovaní odolnosti rastlín voči abiotickým aj biotickým faktorom prostredia [5].

Náš výskum sa zameriava na pochopenie metabolomických a molekulárnych interakcií medzi ovsom siatym a vláknitou hubou *Fusarium*. Skúmaním týchto procesov sa snažíme prispieť k širšiemu pochopeniu obranných mechanizmov rastlín s cieľom produkcie vysokokvalitných a bezpečných primárnych potravinových surovín.

1 Materiál a metodika

V tejto kapitole si popíšeme použitý rastlinný materiál ako aj metódy, ktoré sme využili pri dosiahnutí výsledkov.

1.1 Rastlinný materiál

Použili sme 5 odrôd ovsa siateho (*Avena sativa* L.): Hucul, Tatran, Vaclav, Auron a Pushkinskij, ktoré sa líšia v krajine pôvodu, rokom registrácie, plevnatosťou zŕn. Hucul, Vaclav a Auron produkujú plevnaté zrná, Pushkinskij a Tatran zrná nahé. Kritériom pre výber odrôd bol obsah β-D-glukánu v zrne. Každú odrodu sme vypestovali v kontrolovaných podmienkach, v nádobách, v troch opakovaniach a troch variantoch: kontrola, umelá infekcia FC a umelá infekcia FG.

1.2 Umelá infekcia

Na umelú infekciu sme použili izoláty FG a FC konzervované v zbierke mikroorganizmov v NPPC - VÚRV (Piešťany, Slovenská republika) a pochádzajúce z pšeničných polí na Slovensku. Kultivácia kolónií FG a FC prebehla na zemiakovom-dextrózovom agare (PDA, Difco Lab., Detroit, MI, USA) pri 25 °C počas 21 dní [6]. Pri príprave inokula sme agarové platne s kolóniami húb pokryli sterilnou destilovanou vodou a jemne zoškrabali sporulované vzdušné mycélium. Koncentráciu inokula sme prispôsobili na približne 5 x 10^6 konídií na 1 ml. Aplikovali sme 1 ml suspenzie konídií na každú ovsenú metlinu.

Umelá infekcia prebehla kombináciou sprejovanej metódy a prikrytia rastlín polyetylénovým vakom vo fáze kvitnutia po dobu 48 h [7], pričom po aplikácii inokula sme metliny zakryli polyetylénovými vreckami na 48 h. Kontrolná skupina bola postriekaná destilovanou vodou bez prikrytia. Rastliny sme v kontrolovaných podmienkach nechali dozrieť a zozbierali sme 15 metlín z každého variantu a opakovania. Zrná sme manuálne vylúpali a použili na ďalšie analýzy. Pred analýzou sme zrná pomleli na hrúbku 0,5 mm a stanovili sušinu pomocou automatického analyzátora pri teplote 110 °C.

1.3 Izolácia DNA

Mycéliá FC a FG pestované na Petriho miskách boli zoškrabané a homogenizované na jemný prášok pomocou tekutého dusíka. Patogénna DNA bola extrahovaná pomocou kitu "DNeasy Plant Maxi Kit“ (Qiagen, Nemecko). Zrná analyzovaného ovsa (infikovaného a kontrolovaného) sa jemne pomleli a 1 g prášku sa použil na izoláciu celkovej DNA s použitím rovnakého kitu "DNeasy Plant Maxi Kit" ako pre mycélium húb. Koncentrácia a kvalita izolovanej DNA bola skontrolovaná spektrofotometricky pomocou spektrofotometra NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) a celková DNA bola kvantifikovaná pomocou Qubit™ Flex Fluorometer (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Všetky vzorky DNA získané z ovsa sa zriedili na koncentráciu 25 ng/ul. DNA sme premiestnili do mikroskúmaviek a zmrazili pre ďalšie hodnotenie prítomnosti patogénnej DNA.

1.4 Analýza množstva DNA

Na analýzu množstva DNA v zrnách ovsa siateho sme použili real-time PCR na prístroji ABI PRISM® 7000. Pre kvantifikáciu patogénnej DNA FC sme využili sondu TaqManTM FC92s1 s primérovým párom FC92s1

forward a FC92s1 reverzný, generujúc amplikón veľkosti 92 bp [8]. Kvantifikácia DNA FG bola uskutočnená so sondou TaqManTM TMFg12p a primérovým párom TMFg12 forward a TMFg12 reverz, s referenčnou veľkosťou 103 bp [9].

PCR reakčná zmes obsahovala 25 µl TaqMan Universal PCR Master Mix, 300 nM každého primeru, 200 nM sondy TaqManTM a 2 µl DNA (50 ng). Podmienky PCR boli 95 °C počas 10 minút, 40 cyklov: 95 °C počas 15 sekúnd, 60 °C počas 1 minúty. Pre štandardné krivky sme použili päť riedení DNA patogénov izolovanú z mycélia FC a mycélia FG (1; 10; 100; 1000 a 10 000 pg/ul) v troch opakovaniach. Software ABI PRISM® 7000 bol následne použitý na kvantifikáciu neznámych vzoriek interpoláciou Ct hodnôt. Obsah DNA patogénov sme vyjadrili v ng DNA/g zrna a percento infekcie sme vypočítali ako (DNA *Fusarium*/celková DNA) × 100.

1.5 Stanovenie obsahu β-D-glukánu

Obsah β-D-glukánu v rastlinných vzorkách sme stanovili s použitím analytického kitu "Mixed-linkage β-glucan assay procedure" (KBGLU, BBG 5/03). Vzorku (100 mg) sme homogenizovali v 30 ml centrifugačnej skúmavke s 200 µl 50 % (v/v) etanolu a 4 ml 20 mmol.dm^{-3} sodno-fosforečnanového tlmivého roztoku (pH 6,5). Inkubovali sme ju pri 100 °C po dobu 2 min, temperovali pri 50 °C, pridali lichenázu a inkubovali ďalej pri 50 °C. Po ustálení sme vzorky centrifugovali a odobrali 100 µl supernatantu do troch skúmaviek. Do dvoch z nich sme pridali 100 µl roztoku β-glukozidázy (0,2 U), a do tretej skúmavky (blank) sme pridali 100 µl 50 mmol.dm^{-3} sodno-octanového tlmivého roztoku (pH 4,0). Inkubovali sme ich 10 min pri 50 °C a následne sme pridali 3 ml enzýmového činidla GOPOD a inkubovali pri 50 °C 20 min. Spektrofotometricky sme zmerali extinkciu vzoriek pri vlnovej dĺžke 510 nm a prepočítali na obsah β-D-glukánu a sušinu.

1.6 Štatistické vyhodnotenie nameraných dát

Použili sme t-test na porovnanie obsahu β-D-glukánu medzi kontrolou a infikovanými odrodami ovsa (FC a FG) s 95 % hladinou významnosti. Medzi kontrolnými odrodami a infikovanými odrodami sme využili analýzu variácie (ANOVA) a post hoc LSD test pri $p \leq 0,05$ na stanovenie signifikantných rozdielov.

Štatistické výpočty sme realizovali softvérom Statgraphics. Pre analýzu hlavných komponentov (PCA) sme využili softvér Past 3 (PAleontological STatistics) na posúdenie vplyvu obsahu β-D-glukánu na množstvo patogénnej DNA.

2 Výsledky a diskusia

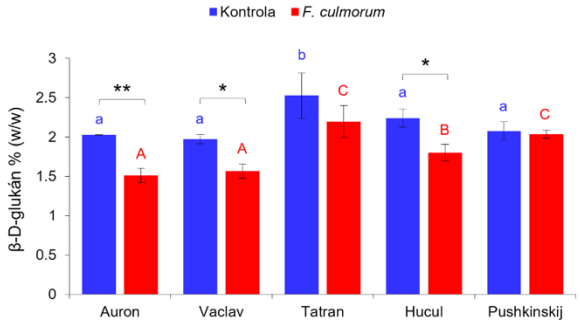
Nami analyzovaný súbor zahŕňal 5 odrôd ovsa siateho, medzi ktorými sme pozorovali genotypové rozdiely s ohľadom na ich plevnatosť, pôvod alebo rok registrácie. Kritériom pre diverzifikáciu vzoriek bol aj vstupný obsah β-D-glukánu v zrnách. Výsledky ukázali, že hodnoty obsahu β-D-glukánu v zrnách ovsa siateho sa pohybovali od najnižšej 1,97 % (odroda Vaclav) po najvyššiu hodnotu 2,53 % (odroda Tatran), s priemerom 2,17 %. Tieto výsledky sú v súlade s literárnymi referenciami, ktoré opisujú percentuálne zastúpenie β-D-glukánu v rozmedzí 2,0 až 6,77 % [10, 11]. Literatúra však zdôrazňuje, že na obsah β-D-glukánu vplýva nie len genotyp, ale aj prostredie [12].

Zistili sme, že štatisticky najvyšší podiel β-D-glukánu vykazovala odroda Tatran (2,53 %). Tatran patrí medzi nahé odrody ovsa a jeho krajina pôvodu je Slovenská republika. Naopak, najnižší obsah β-D-glukánu sme namerali v odrode Vaclav (1,97 %). Táto odroda rovnako pochádza zo Slovenska, ale zaraďuje sa medzi plevnaté odrody. Druhou nahou odrodou ovsa v našom experimente bola odroda Pushkinskij (2,08 %), ktorej krajina pôvodu je Rusko. Zvyšné dve odrody Auron (2,03 %) a Hucul (2,24 %), pochádzajúce z Česka (Auron) a Slovenska (Hucul), patria medzi plevnaté odrody, spomedzi ktorých musíme vyzdvihnúť odrodu Hucul, ktorá sa líši od typicky žlto sfarbených pliev zŕn čiernou farbou plevy.

V nadväznosti sme sa zamerali na vplyv patogénov obilnín, FG a FC, na obsah β-D-glukánu v zrnách ovsa siateho. Grafy 1 a 2 podrobne prezentujú výsledky obsahu β-D-glukánu pred a po infekcii FC a FG pre jednotlivé odrody. Naša štúdia identifikovala výrazné rozdiely v reakcii odrôd na infekciu, pričom nahé odrody vykazovali menšiu stratu β-D-glukánu v porovnaní s plevnatými. Zároveň tieto straty β-D-glukánu pri nahých odrodách, na rozdiel od ostatných odrôd, neboli štatisticky významné.

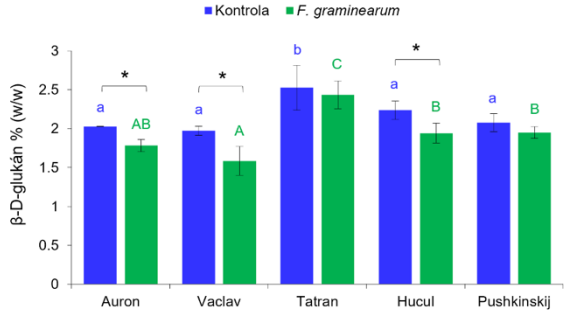
Graf 1 zobrazuje hodnoty β-D-glukánu, ktoré boli preukazne vyššie v zrnách kontrolných vzoriek pred umelou infekciou. Najvýraznejšie rozdiely v obsahu β-D-glukánov sme zaznamenali vo vzorkách Auron (1,51 %) a Vaclav (1,56 %), ktorých celkový obsah β-D-glukánu klesol o 25,48 % a 20,73 %. Tretí najvyšší pokles sme zaznamenali v čiernoplevnatej odrode Hucul (1,8 %) s poklesom o 19,60 % v porovnaní s kontrolou. Najnižší percentuálny pokles preukázal Pushkinskij (2,03 %) s minimálnym poklesom skúmaného polysacharidu iba o 2,03 %. Tatran (2,19 %), s rozdielom 13,2 % oproti kontrole, predstavuje

druhú odrodu s najmenšou stratou β-D-glukánu po umelej infekcii.



Graf 1: Obsah β-D-glukánu (v %) v kontrolných (a, b) a infikovaných FC (A, B, C) odrodách ovsa siateho (LSD, p ≤ 0,05). Porovnanie obsahu β-D-glukánu medzi kontrolnou a FC infikovanou tou istou odrodou pomocou t-testu (počet hviezdičiek zodpovedá miere signifikancie, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,001).

Z Grafu 2 je zrejmé, že vo všetkých sledovaných odrodách došlo k percentuálnemu poklesu v zrne zastúpeného β-D-glukánu vplyvom umelej infekcie s FG. Najväčší percentuálny rozdiel medzi kontrolami a vzorkami po infekcii bol preukázaný pri plevnatých odrodách: Vaclav (pokles o 19,66 %), Hucul (-13,30 %) a Auron (-12,16 %). Naopak najnižšiu stratu sledovaného metabolitu sme zaznamenali pri nahých zrnách. Priemerná hodnota β-D-glukánu pri odrode Pushkinskij (1,95 %) klesla o 6,05 %, zatiaľ čo najmenší pokles sme zaznamenali pri odrode Tatran (2,43 %), iba o 3,61 % oproti kontrole.

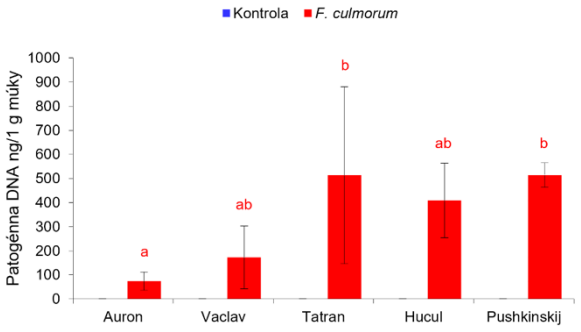


Graf 2: Obsah β-D-glukánu (v %) v kontrolných (a, b) a infikovaných FG (A, AB, B, C) odrodách ovsa siateho (LSD, p ≤ 0,05). Porovnanie obsahu β-D-glukánu medzi kontrolnou a FG infikovanou tou istou odrodou pomocou t-testu (počet hviezdičiek zodpovedá miere signifikancie, * p ≤ 0,05).

Zistili sme, že nahé odrody ovsa stratili po infekcii menšie množstvo β-D-glukánu ako plevnaté. Konkrétne, nahé odrody infikované FG stratili v priemere 4,71 % β-D-glukánu a pri FC 8,16 %. Tieto výsledky sú porovnateľne nižšie oproti finálnemu poklesu β-D-glukánu vo vzorkách plevnatých odrôd, kde sme zaznamenali pokles o 14,94 % (FG) a 15,05 % (FC).

Tento pokles je pravdepodobne spôsobený dvoma hlavnými faktormi. Prvým faktorom je využitie ovsených β-D-glukánov parazitickými organizmami (hubami *Fusarium*). Tie ich využívajú ako zdroj energie počas interakcie s hostiteľskou rastlinou. Enzýmy produkované patogénmi, napr. β-glukanázy, prispievajú k nižšiemu obsahu β-D-glukánu v infikovaných zrnách prostredníctvom rozkladu zlúčenín bohatých na glukózu [5, 13, 14]. Druhým faktorom je znížená dostupnosť cukrov a ďalších živín, čo vedie k obmedzeniu syntézy β-D-glukánu vo vyvíjajúcich sa zrnách [13, 15]. Táto interakcia medzi patogénom a rastlinou vedie k nižším stratám β-D-glukánu v nahých odrodách v porovnaní s plevnatými, odhaľujúc ochrannú funkciu β-D-glukánu.

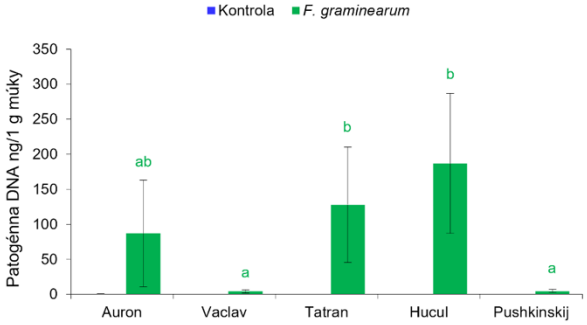
V rámci výskumu ako prejav infekcie sme následne skúmali prítomnosť patogénnej DNA. Grafy 3 a 4 zobrazujú množstvo patogénnej DNA druhu FC a FG v kontrolných a infikovaných odrodách ovsa siateho. Odrody s nahými zrnami, najmä Pushkinskij (514,42 ng/g) a Tatran (513,49 ng/g), vykazovali najvyššie koncentrácie patogénnej DNA FC v porovnaní s plevnatými odrodami, kde Hucul (408,71 ng/g), Vaclav (173,22 ng/g) a Auron (74,105 ng/g) vykazovali nižšie množstvá.



Graf 3: Množstvo patogénnej DNA FC (ng na 1 g múky) v kontrolných a infikovaných odrodách ovsa siateho (a,ab, b) (LSD, p ≤ 0,05).

Hladiny DNA FG boli konzistentne nižšie v porovnaní s FC vo všetkých analyzovaných vzorkách. Je zaujímavé, že Hucul, ktorý sa vyznačuje výraznými čiernymi plevami, vykazoval najvyššiu koncentráciu sledovanej patogénnej DNA (186,62 ng/g). Druhou odrodou s najvyššou koncentráciou patogénnej DNA je odroda Tatran (127,77 ng/g), zatiaľ čo plevnatá odroda Auron

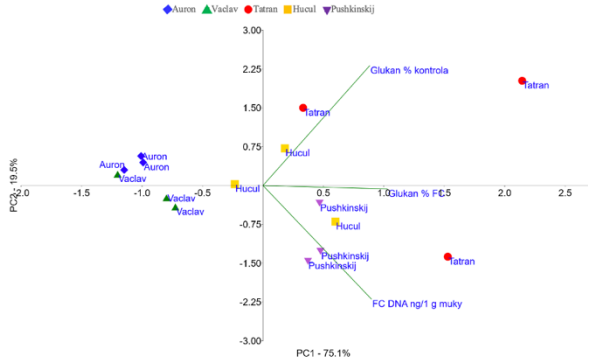
sa umiestnila na treťom mieste (86,94 ng/g). Zvyšné dve odrody, Pushkinskij a Vaclav, vykazovali preukazne nižšie množstvá patogénnej DNA FG v zrne, konkrétne 4,55 a 4,37 ng/g.



Graf 4: Množstvo patogénnej DNA FG (ng na 1 g múky) v kontrolných a infikovaných odrodách ovsa siateho (a, ab, b) (LSD, $p \leq 0,05$).

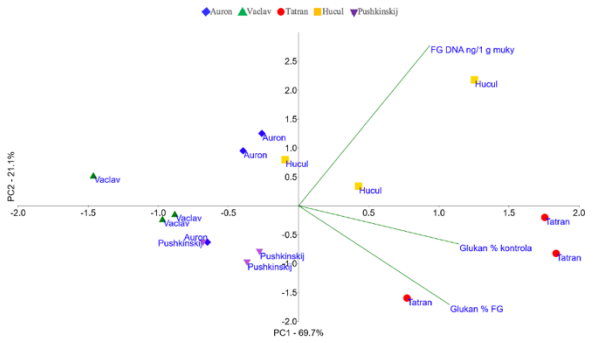
Havrlentová et al. [14] a Martin et al. [16] dokumentovali nižšie percento patogénnej DNA v nahých zrnách oproti plevnatým, kde boli hodnoty výrazne vyššie. My sme preukázali iné výsledky, percentuálne vyššiu prítomnosť patogénnej DNA (FG aj FC) v nahých zrnách (2,3 %), kde bola zaznamenaná minimálna strata β-D-glukánu po infekcii, oproti plevnatým (2,07 %). Táto odchýlka môže byť dôsledkom komplexnej interakcie genotypov ovsa, obsahu β-D-glukánu a ich reakcie na infekciu, čo do istej miery potvrdzujú aj naše výsledky vyhodnotené analýzou hlavných komponentov (graf 5, graf 6).

Výsledky z grafu 5 ukazujú, že z celého súboru analyzovaných odrôd sú vyčlenené odrody Auron a Vaclav, ktoré vykázali najmenej β-D-glukánu po infekcii FC a aj najmenej patogénnej DNA FC a vykazujú pri týchto faktoroch negatívnu koreláciu.



Graf 5: Analýza hlavných komponentov vyjadrujúca mieru vplyvu obsahu β-D-glukánu v kontrolných a infikovaných odrodách a množstva patogénnej DNA FC na rozdelenie jednotlivých odrôd.

Zhodnotením grafu 6 môžeme konštatovať, že pri umelej infekcii FG sa k odrodám Auron a Vaclav pripojila aj odroda Pushkinskij, pričom všetky tri odrody sa vyznačovali preukazne nízkou koncentráciou patogénnej DNA po infekcii FG, ktorá nebola medzi týmito odrodami štatisticky významná. Dokonca odrody Vaclav a Pushkinskij mali hodnoty extrémne nízke, rádovo 100-násobne nižšie ako zvyšné hodnotené odrody (graf 4).



Graf 6: Analýza hlavných komponentov vyjadrujúca mieru vplyvu obsahu β-D-glukánu v kontrolných a infikovaných odrodách a množstva patogénnej DNA FG na rozdelenie jednotlivých odrôd.

Záver

Umelá infekcia vyvíjajúcich sa zŕn ovsa siateho druhmi FC a FG spôsobila štatisticky preukazný pokles v obsahu β-D-glukánu v plevnatých odrodách. Nahé odrody ovsa stratili po infekcii menšie množstvo β-D-glukánu v zrelom zrne ako plevnaté a pokles nebol štatisticky preukazný. Preukazne najvyššia prítomnosť patogénnej DNA FC bola sledovaná v nahých odrodách, čo sa nepotvrdilo pri FG, kde nahá odroda Pushkinskij mala preukazne najmenej patogénnej DNA v zrne. Analýza hlavných komponentov v prípade umelej infekcie FC vyselektovala odrody Auron a Vaclav, ktoré vykazovali preukazne menej β-D-glukánu aj patogénnej DNA po infekcii. V prípade infekcie FG sa v reakcii na patogén selektovala okrem odrôd Auron a Vaclav aj odroda Pushkinskij.

Poďakovanie

Táto práca bola uskutočnená na pracovisku Národného poľnohospodárskeho a potravinárskeho centra - Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch v rámci projektov APVV-17-0113 a APVV-18-0154.

Použitá literatúra

[1] PRASADI, N. a JOYE, I. 2020. Dietary Fiber from Whole Grains and Their Benefits on Metabolic

Health. In Nutrients, vol. 12, no. 10, pp. 3045 ISSN 2072-6643.

[2] ZHANG, J. et al. 2020. Analysis of β-D-glucan biosynthetic genes in oats reveals glucan synthesis regulation by light. In Annals of Botany, vol. 127, no. 3, p. 371-380 ISSN 1095-8290.

[3] BECHER R. et al. 2013. Biology, Diversity, and Management of FHB-Causing *Fusarium* Species in Small-Grain Cereals. In The Mycota, vol. 11, pp. 199-241 ISBN 978-3-642-36820-2.

[4] CHANG, S. C. et al. 2021. Structures, Biosynthesis, and Physiological Functions of (1,3;1,4)-β-D-Glucans. In Cells, vol. 10, no. 3, pp. 510 ISSN 2073-4409.

[5] JAENDET, P. et al. 2022. The Role of Sugars in Plant Responses to Stress and Their Regulatory Function during Development. In International Journal of Molecular Science, vol. 23, no. 9, pp. 5161 ISSN 3556-3551.

[6] ŠLIKOVÁ, S. a kol. 2017. Ovos-infekcia hubami *Fusarium* spp. v poľných podmienkach. Edičné stredisko NPPC – Výskumný ústav pôdoznalectva a ochrany pôdy. Bratislava. 2017, 117 s.

[7] TVARŮŽEK, L. a kol. 2012. Metodika pro zakládání a hodnocení pokusů s umělou inokulací obilnin fuzáriózami klasů. Agrotest fyto s. r. o. s. s. 1-16 ISBN 978-80-87555-09-5.

[8] LEIŠOVÁ, L. et al. 2006. Quantification of *Fusarium culmorum* in wheat and barley tissues using real-time PCR in comparison with DON content. In J. Phytopathol, vol. 154, no. 10, pp. 603–611 ISSN 0931-1785.

[9] YLI-MATTILA , S. et al. 2008. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum, F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia, In Archives of Phytopathology and Plant Protection, vol. 41, no. 4, pp. 243-260 ISSN 0323-5408.

[10] HAVRLENTOVÁ, M. et al. 2011. The putative role of cell wall β-D-glucan in oat grain in thermal stress. In: AGRISAFE final conference: Climate change: challenges and opportunities in agriculture. Budapest: Agricultural research institute of the Hungarian Academy of Science, 2011. pp. 171- 174 ISBN 978- 963-8351-37-1.

[11] REDAEILLI, et al. 2013. Genetic and environmental variability in total and soluble β-glucan in European oat genotypes. In Journal of Cereal Science, vol. 57, no. 1, pp. 185-192 ISSN 0133-3732.

[12] LAZARIDOU A., BILIADERIS C.G. 2007. Molecular Aspects of Cereal β-Glucan Functionality: Physical Properties, Technological Applications and Physiological Effects. In J. Cereal Sci, vol. 46, no. 2, pp. 101-118 ISSN 2305-5839.

[13] OLIVEIRA P.M., et al. 2012. Fundamental study on the influence of *Fusarium* infection on quality and ultrastructure of barley malt. In Int. J. Food Microbiol, vol. 156, no. 1, pp. 32–43 ISSN 2242-4933.

[14] HAVRLENTOVÁ, M. et al. 2020. Relationship between the Content of β-D-Glucans and Infection with *Fusarium* Pathogens in Oat (*Avena sativa* L.). In Plants, vol. 9, no. 1776, pp. 1-14 ISBN 978- 963-8351-37-1.

[15] WILSON, S.M. et al. 2012. Pattern of deposition of cell wall polysaccharides and transcript abundance of related cell wall synthesis genes during differentiation in barley endosperm. In Plant Physiol, vol. 159, no. 2, pp. 655–670 ISSN 1532-2548.

[16] MARTIN, C. et al. 2018. Resistance against *Fusarium graminearum* and the relationship to β-glucan content in barley grains. In Eur J Plant Pathol, vol. 152, no. 10, pp. 621-634 ISSN 0929-1873.

Príprava nanočastíc striebra zelenou syntézou

Preparation of silver nanoparticles by green synthesis

Simona Tkáčiková[1] – Jana Moravčíková[1]
Školiteľ: Jana Moravčíková
[1]Ústav biológie a biotechnológií, oddelenie biotechnológií, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
tkacikova1@ucm.sk, jana.moravcikova@ucm.sk

Abstrakt
V práci sme sa zamerali na zelenú syntézu strieborných nanočastíc s využitím dusičnanu strieborného ako prekurzora a vodných extraktov z listov rastlín *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita* a *Ocimum basilicum*. Prítomnosť nanočastíc sme detegovali kvalitatívne farebnou zmenou reakčnej zmesi a spektrofotometricky identifikáciou absorbčného maxima charakteristického pre strieborné nanočastice. Naše výsledky naznačujú, že na tvorbu strieborných nanočastíc má významný vplyv prítomnosť polyfenolov a flavonoidov v rastlinných extraktoch.

Kľúčové slová: dusičnan strieborný, nanočastice, rastlinný extrakt, zelená syntéza

Abstract
In this work, we focused on the green synthesis of silver nanoparticles using silver nitrate as a precursor and water extracts from the leaves of the plants *Salvia officinalis, Melissa officinalis L., Mentha piperita* and *Ocimum basilicum*. We detected the presence of nanoparticles qualitatively by the color change of the reaction mixture and spectrophotometrically by identifying the absorption maximum characteristic for silver nanoparticles. Our results indicate that the presence of polyphenols and flavonoids in plant extracts has a significant effect on the formation of silver nanoparticles.

Key Words: green synthesis, nanoparticles, plant extract, silver nitrate

Úvod

Nanotechnológie patria medzi rýchlo rozvíjajúcu sa multidisciplinárnu výskumnú oblasť [1]. Rôzne nanomateriály ako napríklad kovové nanočastice (NČ), získavajú čoraz väčšiu pozornosť, vďaka svojim výnimočným optickým, mechanickým a chemickým vlastnostiam, ktoré súvisia s pomerom ich veľkého povrchu k objemu [2, 3]. Produkciu NČ je možné zabezpečiť viacerými metódami, vrátane fyzikálnej, chemickej ale aj biologickej tzv. „zelenej syntézy“ [1]. V poslednom období je zvýšený záujem o využitie biologických prístupov na syntézu NČ, hlavne z dôvodu ich biokompatibility a prístupu k životnému prostrediu. Navyše, biologické prístupy spĺňajú koncept „zelenej chémie“ [4]. Nanočastice môžu byť syntetizované s využitím rastlinných extraktov, alebo aj pomocou rôznych mikroorganizmov [4, 5].

Hlavnou výhodou biologických prístupov syntézy NČ z rastlinných extraktov je použitie ekologického rozpúšťadla ako je voda a využitie redukčných a stabilizačných činidiel, ktoré sú prítomné v extraktoch ako sú napr. rôzne fytochemikálie. Výhodou použitia rastlinných extraktov na redukciu kovových iónov je aj to, že reakcia prebieha v krátkom čase a nevyžaduje vysoké teploty, pričom rýchla redukcia iónov je spôsobená schopnosťou fytochemikálií a ich funkčných skupín odovzdať elektróny komplexom kovových iónov [6, 7, 8, 9].

Nanočastice striebra našli svoje využitie v rôznych odvetviach priemyslu. Vyznačujú sa optickými, elektrickými a tepelných vlastnosťami v dôsledku čoho našli využitie v širokej škále produktov ako sú antimikrobiálne látky, kozmetické výrobky, obalové materiály na potraviny, nádoby na skladovanie potravín, čistiace prostriedky a farby [10,11]. Aplikácie strieborných nanočastíc je možné implementovať aj v poľnohospodárstve, kde prispievajú k zlepšeniu klíčenia a fyziológie rastlín, k odolnosti rastlín voči hubovým a bakteriálnym ochoreniam alebo háďatkám [10, 12, 13, 14].

Cieľom práce bolo pomocou biologického prístupu preskúmať možnosti syntézy strieborných nanočastíc s využitím vodných extraktov z rastlinných druhov ako je šalvia lúčna, medovka lekárska, mäta prieporná a bazalka pravá.

1 Materiál a metódy

V tejto kapitole si popíšeme použitý rastlinný materiál ako aj metódy, ktoré boli potrebné pre dosiahnutie výsledkov.

1.1 Rastlinný materiál

Ako rastlinný materiál sme použili listy šalvie lúčnej (*Salvia officinalis*), medovky lekárskej (*Melissa officinalis* L.), mäty priepornej (*Mentha piperita*) a bazalky pravej (*Ocimum basilicum*). Materiál použitý bol zakúpený v obchodnom reťazci v Trnave.

1.2 Príprava rastlinného extraktu

Listy (10 g) sme narezali na čo najmenšie segmenty, pridali do 150 cm^3 sterilnej vody a následne sme zmes zahrievali vo vodnom kúpeli pri 80 °C počas 30 minút. Rastlinné extrakty sme po vychladení prefiltrovali cez filtračný papier do čistých sterilných nádob a uskladnili v chladničke pri 4 °C na ďalšie použitie.

1.3 Stanovenie celkového obsahu flavonoidov a polyfenolov

Celkový obsah flavonoidov sme stanovili podľa [15]. Reakčnú zmes sme pripravili zmiešaním 0,5 cm^3 extraktu s 1,5 cm^3 2 % (w/v) roztoku chloridu hlinitého. Reakčnú zmes sme inkubovali 10 minút pri izbovej teplote a spektofotometricky sme zmerali absorbanciu pri vlnovej dĺžke 405 nm. Výsledky sme vyjadrili ako ekvivalent kvercetínu v $mg.cm^{-1}$.

Celkový obsah polyfenolov sme stanovili podľa [16]. Reakciu sme uskutočnili zmiešaním 0,5 cm^3 vzorky extraktu s 0,5 cm^3 Folin- Ciocalteau reagenciou a následne sme reakčnú zmes inkubovali 5 minút pri laboratórnej teplote. Následne sme k reakčnej zmesi pridali 1 cm^3 5% (w/v) vodného roztoku uhličitanu sodného a inkubovali 20 minút pri laboratórnej teplote. Spektofotometricky sme zmerali absorbanciu pri vlnovej dĺžke 630 nm. Výsledné hodnoty vyjadrili ako ekvivalent kyseliny gálovej v $mg.cm^{-1}$.

1.4 Syntéza nanočastíc striebra

Ako prekurzor na syntézu strieborných nanočastíc sme použili 1 $mmol.dm^{-3}$ $AgNO_3$ Reakciu sme pripravili zmiešaním rastlinného extraktu a roztoku $AgNO_3$ v pomere 1:9 Zmes sme následne zahrievali pri 80 °C počas 30 minút na trepačke za neustáleho miešania. Po skončení inkubácie sme koloidného roztoky skladovali v chladničke pri teplote 4 °C.

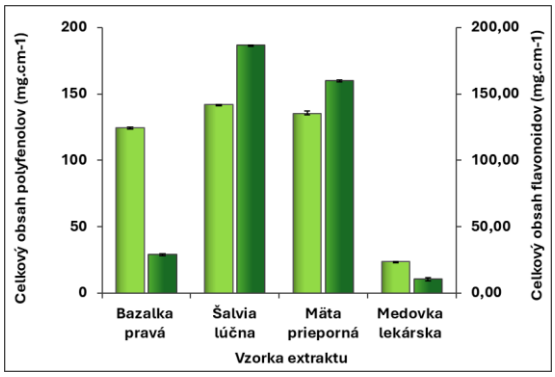
1.5 Charakterizácia strieborných nanočastíc

Potenciálnu tvorbu nanočastíc sme najskôr detegovali kvalitatívnym vyhodnotením farebnej zmeny koliodného roztoku, a následne meraním absorbancie pomocou UV-Vis spektrofotometrie pri vlnových dĺžkach v rozsahu od 300 do 700 nm. Ako blank sme použili vodný roztok $AgNO_3$ s koncentráciami 1 $mmol.dm^{-3}$. Koloidné roztoky sme pred analýzou centrifugovali pri 14 000 rpm 30 minút. Supernatant sme odstránili, usadené nanočastice sme premyli sterilnou vodou a opakovali sme centrifugáciu pri 3000 rpm 10 minút. Izolované nanočastice vo forme sedimentu sme pred meraním absorbancie rozsuspendovali v 2 cm^3 sterilnej vody.

2 Výsledky a diskusia

V práci sme zamerali na syntézu strieborných nanočastíc prostredníctvom prístupov zelenej syntézy. Zelená syntéza využíva rastlinné extrakty na redukciu kovových iónov. Predstavuje ekologickejšiu metódu, ktorá je lacnejšia, redukuje znečistenie a prispieva k ochrane životného prostredia a ľudského zdravia [17]. Hlavnou výhodou použitia rastlinných extraktov je bezpečná manipulácia s materiálom, ľahká dostupnosť a značné zastúpenie metabolitov a fytochemikálií, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v procese redukcie a stabilizácia nanočastíc a nanomateriálov na báze kovov [18, 19].

Ako redukčné a stabilizačné činidlá sme využili rastlinné extrakty z listov medovky lekárskej (*Melissa officinalis* L.), šalvie lúčnej (*Salvia officinalis*), bazalky pravej (*Ocimum basilicum*) a mäty priepornej (*Mentha piperita*). Pri výbere rastlinného materiálu sme sa primárne zamerali na rastliny, ktoré sú významné z hľadiska medicínskeho využitia vďaka vysokému obsahu bioaktívnych látok, nakoľko prítomné fytochemikálie v rastlinách, môžu mať vplyv na rýchlosť redukcie kovových iónov a vznik nanočastíc [20]. Preto sme v rámci experimentu stanovili celkový obsah polyfenolov a flavonoidov v použitých extraktoch. Tieto skupiny sekundárnych metabolitov mohli byť potencionálnymi molekulami podieľajúcimi sa na stabilizácií a redukcií iónov striebra Ag^+ na Ag^0 [21]. Namerané hodnoty sú uvedené v Grafe 1.

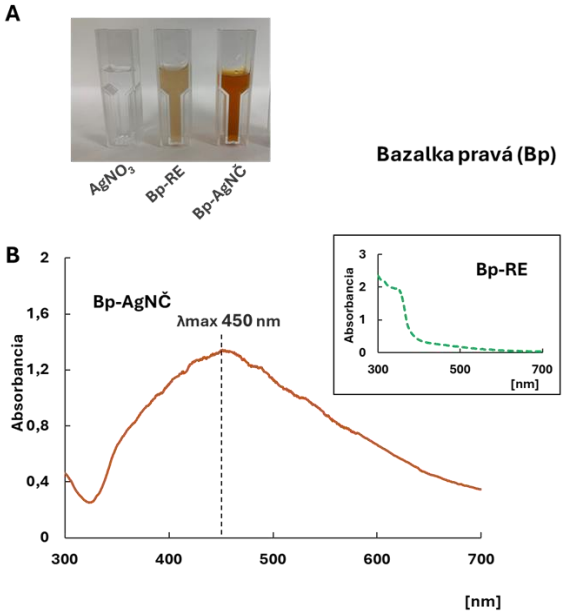


Graf 1 Stanovenie celkového obsahu polyfenolov (bledozelená farba stĺpca) a flavonoidov (tmavozelená farba stĺpca) v rastlinných extraktoch použitých pri syntéze strieborných nanočastíc.

Extrakty bazalky pravej (Bp), šalvie lúčnej (Šl) a mäty priepornej (Mp) vykázali minimálne 5 krát vyšší obsah celkových polyfenolov v porovnaní s ich obsahom v extrakte z listov medovky lekárskej (Ml). Prítomnosť polyfenolov vo vzorke sme detegovali aj kvalitatívne zmenou sfarbenia roztoku po určitom čase inkubácie zo žltej na modrozelenú farbu.
Najvyšší obsah flavonoidov sme zistili pri vzorkách šalvie lúčnej (Šl) a mäty priepornej (Mp). Nízky obsah flavonoidov (v prorovnaní so Šl a Mp) sme pozorovali pri vzorkách bazally pravej (Bp) a medovky lekárskej (Ml).

V ďalšej časti experimentu sme sa zamerali na syntéze strieborných nanočastíc (Ag NČ), pri ktorej sme používali ako prekurzor $AgNO_3$ v koncentrácii 1 $mmol.dm^{-3}$. Reakčnú zmes, ktorá pozostávala z rastlinného extraktu a prekurzora v pomere 1 : 9, sme zahrievali pri 80 °C počas 30 minút. Po 15 minútach sme pozorovali farebnú zmenu, pričom došlo k zmene zo žltej resp. žltozelenej na červenohnedú farbu roztoku pri všetkých rastlinných extraktoch (Obrázok 1A, Obrázok 2A, 0brázok 3A, Obrázok 3A), čo indikovalo prítomnosť Ag NČ v roztoku, a to v dôsledku excitácie plazmónov na povrchu atómovej mriežky materiálov v nanoúrovni za vplyvu svetelného žiarenia. AgNČ vykazujú vďaka povrchovej plazmónovej rezonancií absorpciu vo viditeľnom spektre s maximom absorbancie pri 400-500 nm [22]. Z toho dôvodu sme merali pomocou UV-VIS spektorfotometra merali absorbčné spektrum v rozsahu vlnových dĺžok od 300 do 700 nm v jednotlivých pripravených koloidných roztokoch (Obrázok 1B, Obrázok 2B, Obrázok 3B, Obrázok 3B, Obrázok 4B).

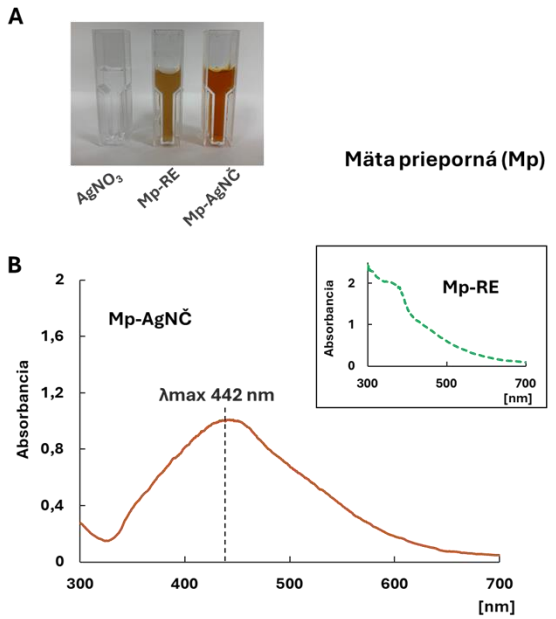
V prípade použitia extraktu bazalky pravej sme namerali absorpčné maximum pri vlnovej dĺžke 450 nm (Obrázok 1B). Na základe šírky píku, ktorý sme získali meraním absorpčného spektra môžeme predpokladať, že sme získali nanočastice rôznej veľkosti a tvaru. Metóda UV-Vis nám umožní detegovať potencionálnu prítomnosť nanočastíc, avšak neumožní nám detailne charakterizovať morfológiu nanočastíc. Kvalitu vzorky však môžeme odpozorovať aj na základe polohy a šírky píku.



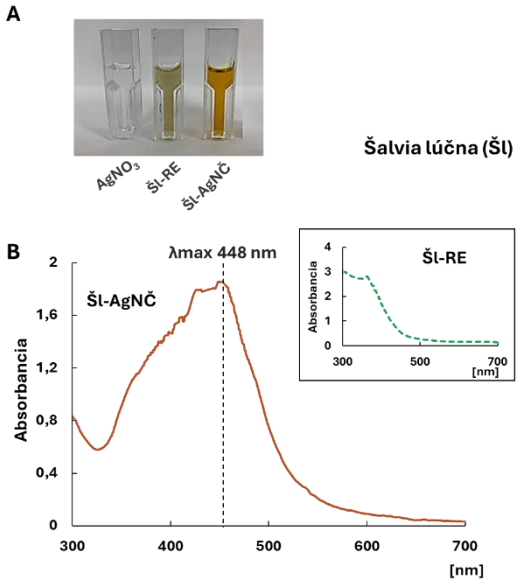
Obrázok 1 Charakterizácia Bp-AgNČ. Kvalitatívna detekcia tvorby nanočastíc (**A**). Absorpčné spektrum Bp-AgNČ a rastlinného extraktu Bp-RE (**B**).

Pri použití extraktu mäty priepornej detegovali maximum vlnovej dĺžky pri 442 nm (Obrázok 2B). Získali kompaktnejší pík v porovnaní so vzorkou Bp-AgNČ, čo môže naznačovať nanočastice menších rozmerov.

Koloidný roztok AgNČ pri použití extraktu šalvie lekárskej vykazoval maximum pri 448 nm (Obrázok 3B). Pri Šl-AgNČ sme namerali najvyššiu maximálnu absorbanciu v porovnaní s ostatnými vzorkami (Obrázok 1B, Obrázok 2B a Obrázok 4B), na základe čoho môžeme predpokladať vysokú koncentráciu strieborných nanočastíc. Predpokladáme, že to môže súvisieť s vyšším obsahom celkových polyfenolov a flavonoidov v tomto rastlinnom extrakte (Graf 1).

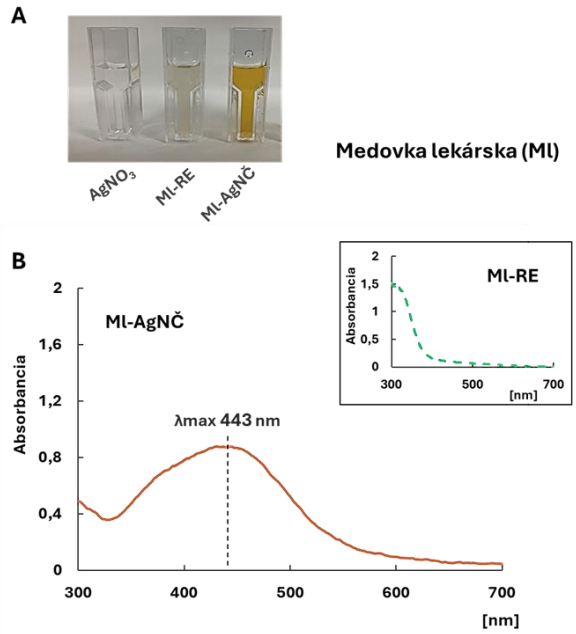


Obrázok 2 Charakterizácia Mp-AgNČ. Kvalitatívna detekcia tvorby nanočastíc (**A**). Absorpčné spektrum Mp-AgNČ a rastlinného extraktu Mp-RE (**B**).



Obrázok 3 Charakterizácia Šl-AgNČ. Kvalitatívna detekcia tvorby nanočastíc (**A**). Absorpčné spektrum Šl-AgNČ a rastlinného extraktu Šl-RE (**B**).

V prípade použitia extraktu z medovky lekárskej sme zaznamenali absorpčné maximum pri 443 nm (Obrázok 4B). Avšak, maximálna absorbancia bola najnižšia v porovnaní s ostatnými vzorkami. To môže súvisieť s nízkym obsahom celkových polyfenolov a flavonoidov v tomto extrakte v porovnaní s ostatnými vzorkami (Graf 1), v dôsledku čoho proces redukcie nemusel byť dostatočný. Rovnako aj absorpčné maximum bolo najnižšie v porovnaní s ostatnými vzorkami AgNČ (Obrázok 1B, Obrázok 2B, Obrázok 3B). Na základe tvaru píku, predpokladáme, že sme získali koloidný roztok Mp-AgNČ s vyšším stupňom polydisperzity. To znamená, že v roztoku sa nachádzali AgNČ väčších rozmerov a s väčšou rozmerovou škálou. Toto by však bolo potrebné potvrdiť ďalšími analýzami, napríklad pomocou metódy DLS [23].



Obrázok 4 Charakterizácia Ml-AgNČ. Kvalitatívna detekcia tvorby nanočastíc (**A**). Absorpčné spektrum Ml-AgNČ a rastlinného extraktu Ml-RE (**B**).

Záver

Metódou zelenej syntézy s využitím prekurzora $AgNO_3$ sme pripravili AgNČ zo všetkých použitých rastlinných extraktov (šalvia lúčna, medovka lekárska, mäta prieporná a bazalka pravá). Prítomnosť AgNČ sme detegovali kvalitatívne farebnou zmenou reakčnej zmesi a spektrofototmetricky identifikovaním absorbčného maxima charakteristického pre AgNČ. Naše výsledky naznačujú, že na tvorbu strieborných nanočastíc má významný vplyv prítomnosť polyfenolov a flavonoidov v rastlinných extraktoch.

.

Poďakovanie
Práca bola vypracovaná v rámci projektov VEGA 1/0230/24 a KEGA 001UCM-4/2022.

Použitá literatúra

[1] THATYANA, M. et al. 2023. Advances in Phytonanotechnology: A Plant-Mediated Green Synthesis of Metal Nanoparticles Using Phyllanthus Plant Extracts and Their Antimicrobial and Anticancer Applications. In Nanomaterials. vol. 13, no. 19, pp. 2616. ISSN 1687-4129.

[2] SALARI, S et. al. 2019. In-vitro Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Potential of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using Prosopis farcta Fruit Extract. In Iranian Journal of Pharmaceutical Research. vol. 18, pp. 430–455. ISSN 1735-0328.

[3] SAREBANHASSANABADI, M. et. al. 2014. Designing a Hydrogen Peroxide Biosensor Using Catalase and Modified Electrode with Magnesium Oxide Nanoparticles. In International Journal of Electrochemical Science. vol. 9, no.1, pp. 257-271. ISSN 1452-3981.

[4] HANO, C. & ABBASI, H. B. 2022. Plant-Based Green Synthesis of Nanoparticles: Production, Characterization and Applications. In Biomolecules. vol. 12, no. 1, pp. 31. ISSN 2218-273X.

[5] NARAYANAN, K.B. & SAKTHIVEL, N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. In Advances in Colloid and Interface Science. vol. 169, no. 2, pp. 59-79. ISSN 0001-8686.

[6] ARYA, A. et. al. 2018. Biogenic Synthesis of Copper and Silver Nanoparticles Using Green Alga Botryococcus braunii and Its Antimicrobial. In Bioinorganic Chemistry and Applications. vol. 2018, pp. 7879403. ISSN 1090-2120.

[7] KUMAR, H. et. al. 2020. Flower-Based Green Synthesis of Metallic Nanoparticles: Applications beyond Fragrance. In Nanomaterials. vol. 10, pp. 766. ISSN 1687-4129.

[8] SONI, V. et. al. 2021. Sustainable and green trends in using plant extracts for the synthesis of biogenic metal nanoparticles toward environmental and pharmaceutical advances: A review. In Environmental Research. vol. 202, pp. 111622. ISSN 1096-0953.

[9] EL-KASSAS, H. Y. & GHOBRIAL, M. G. 2017. Biosynthesis of metal nanoparticles using three marine plant species: Anti-algal efficiencies against “Oscillatoria simplicissima”. In Environmental Science and Pollution Research. vol. 24, no. ?, pp. 7837-7849. ISSN 0944-1344.

[10] ZHANG, F. X. et al. 2016. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. In International Journal of Molecular Sciences, vol. 17, no. 9, pp. 2-34. ISSN 1422-0067.

[11] NAGANTHRAN, A. et. al. 2022. Synthesis, characterization, and biomedical application of silver nanoparticles. In: Materials. vol. 15, no. 2, pp. 2-43. ISSN 1996-1944.

[12] GRUYER, N. et. al. 2014. Interaction between silver nanoparticles and plant growth. In: Acta horticulturae. vol. 1037, pp. 795-800. ISSN 0567-7572.

[13] AHMED, S. et. al. 2016. A review on plants extracts mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. In: Journal of Advanced Research. vol. 7, no. 1, pp. 17-28. ISSN 2090-1232.

[14] KALE, K. S. a kol. 2021. Emerging agriculture applications of silver nanoparticles. In: ES Food and Agroforestry. vol. 3, pp. 17-22. ISSN 2687-7309.

[15] RAKOTOARISON, A. D et al. 1997. Antioxidant activities of polyphenolic extracts from flowers, in vitro callus, and cell suspension cultures of Crataegus monogyna. In Die Pharmazie. vol. 52, no. 1, pp. 60-4. ISSN 0031-7144.

[16] SLINKARD, K. & SINGLETON, V. L. 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. In The American Journal of Enology and Viticulture. vol. 28, no.1, pp. 49-55. ISSN 0002-9254.

[17] YING, S. et. al. 2022. Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. In Environmental Technology & Inovation. vol. 26. pp. 102336. ISSN 2352-1864.

[18] GAVADE, S. J. M. et. al. 2015. Green synthesis of silver nanoparticles by using Acacia concinna fruit extract and their antibacterial activity. In Journal of Nanoscience and Nanotechnology. vol. 9, no. 3, pp. 89-94. ISSN 2738-8743.

[19] JEMILUGBA, O. T. et. al. Green synthesis of silver nanoparticles using Combretum erythrophyllum leaves and its antibacterial activities. In: Colloid and Interface Science Communications. vol. 31, pp. 100191. ISSN 2215-0382.

[20] MUNIR, H. et al. 2021. Plant-mediated green synthesis of nanoparticles. IN: INAMUDDIN, a kol. (Eds.) Advances in Green Synthesis. Nemecko: Springer. 2021. ISBN 978-3-030-67883-8, s. 75–89.
[21] BAWAZEER, S. et. al. 2021. Green synthesis of silver nanoparticles using *Tropaeolum majus*: Phytochemical screening and antibacterial studies. In Green Processing and Synthesis. vol. 10, no. 1, pp. 85-94. ISSN 2191-9550.
[22] BAMAL, D. et. al. 2021. Silver Nanoparticles Biosynthesis, Characterization, Antimicrobial Activities, Applications, Cytotoxicity and Safety Issues: An Updated Review. In Nanomaterials. vol. 11, no. 8, pp. 2086. ISSN 1687-4129.
[23] MOURDIKOUDIS, S. et. al. 2018. Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. In Nanoscale. vol. 10, pp. 12871–12934. ISSN 2040-3372.

Sekcia

Geografia, odborová didaktika

Využitie historického cintorína vo vyučovaní biológie

The use of the historical cemetery in the teaching of biology

Samuel Bednár[1], Marcela Adamcová[1], Lucia Smutná[1], Bianka Žatková[1]
Školiteľ: Marcela Adamcová[1]
[1]Katedra biológie, ekológie a životného prostredia, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica
sbednar@student.umb.sk, Marcela.Adamcova@umb.sk, lucia.smutna@student.umb.sk, bianka.krethova@student.umb.sk

Abstrakt
Práca sa zameriava na využitie historického židovského cintorína v Banskej Bystrici ako prostriedku pre vyučovanie biológie na druhom stupni základnej školy. Iniciatíva bola súčasťou nadnárodného programu „Deep dive“, realizovaného v rámci krúžku „Roots & Shoots“ na ZŠ s MŠ Radvanská 1. Kombinuje zachovanie židovského dedičstva s moderným vzdelávacím systémom a využíva prírodné prostredie cintorína pre výučbu biologických konceptov. Realizácia prebiehala v roku 2023 od marca do mája a zahŕňala informačné stretnutia, laboratórne cvičenia na univerzite a prácu v teréne na cintoríne s použitím pracovných listov. Žiaci sa aktívne zapájali do identifikácie rastlín, živočíchov a symboliky judaizmu, čo podporuje interdisciplinárne prístupy a netradičné vyučovanie. Integrácia moderných technológií, ako sú mobilné aplikácie a QR kódy, zvyšuje zaujímavosť a účinnosť výučby. Táto séria aktivít nielen poskytla študentom praktické a zmysluplné vzdelávanie, ale aj prispela k ochrane a pochopeniu historických miest a kultúrneho dedičstva mesta.

Kľúčové slová: židovský cintorín, interdisciplinarita, symbol, judaizmus

Abstract
The work focuses on the use of the historical Jewish cemetery in Banská Bystrica as a means of teaching biology in the second grade of elementary school. The initiative was part of the transnational program "Deep dive", implemented as part of the "Roots & Shoots" club at the primary school with the Radvanská 1 kindergarten. It combines the preservation of Jewish heritage with a modern educational system and uses the natural environment of the cemetery for teaching biological concepts. Implementation took place in 2023 from March to May and included information sessions, laboratory exercises at the university and field work at the cemetery using worksheets. Pupils were actively involved in identifying plants, animals and the symbolism of Judaism, which supports interdisciplinary approaches and non-traditional teaching. The integration of modern technologies, such as mobile applications and QR codes, increases the interest and effectiveness of teaching. This series of activities not only provided students with practical and meaningful learning, but also contributed to the preservation and understanding of the city's historical sites and cultural heritage.

Key Words: Jewish cemetery, interdisciplinarity, symbol, Judaism

Úvod

V kontexte rozmanitosti vyučovacích metód a prístupov k vzdelávaniu v súčasnej pedagogickej praxi sa stále viac hľadá spôsob, ako zaujať žiakov a spestriť vyučovací proces. Jedným z týchto zaujímavých prístupov je využitie historických miest ako živých učební, ktoré ponúkajú študentom jedinečnú možnosť priblížiť sa k minulosti a rozvinúť svoje vedomosti. Cintorín môže byť vnímaný ako expozícia, kde je možné získať hlbší pohľad na kultúru a históriu lokality, kde sa nachádza. V tomto ohľade je židovský cintorín v Banskej Bystrici príkladom takéhoto historického miesta, ktorého využitie v rámci vyučovacieho procesu nie len dejepisu môže byť obohacujúcim a inšpiratívnym zážitkom aj pri výučbe biológie [1].

Realizácia tejto iniciatívy spadala pod program nesúci názov „Deep Dive“. Spomínaný program zastrešovala organizácia The Foundation for Jewish Heritage s podporou organizácií Centropa a ESJF (European Jewish Cemeteries Initiative).

Nami stanovené ciele boli:

- Vytvorenie edukačných materiálov vo forme pracovných listov, ktoré kombinujú vyučovacie predmety biológia a dejepis.
- Realizácia interdisciplinárneho vyučovania žiakov druhého stupňa základnej školy na

historickom cintoríne a aplikácia vytvorených pracovných listov.

1. Teoretické a metodické východiská práce

V rámci vzdelávania nie len na druhom stupni, je žiadúce rozvíjať interdisciplinaritu ktorá umožňuje študentom prepojiť znalosti z rôznych oblastí a aplikovať ich v praxi. Využitie židovského cintorína v procese vyučovania biológie a dejepisu ponúka jedinečnú príležitosť na praktické, nevšedné a zmysluplné vzdelávanie.

1.1 Deep dive

Projekt „Deep Dive“ je priekopníckou iniciatívou zameranou na ochranu židovských cintorínov v celej strednej a východnej Európe zvyšovaním povedomia, ich začlenením do školských osnov a umožnením miestnych komunít prevziať zodpovednosť za ich ochranu. Projekt, ktorý zastrešujú popredné mimovládne organizácie zamerané na zachovanie židovského dedičstva The Foundation for Jewish Heritage, ESJF a Centropa (Obr. 1) – je súčasťou pilotného programu financovaného EÚ, ktorý prebiehal v siedmich európskych krajinách: Gruzínsko, Maďarsko, Litva, Moldavsko, Poľsko, Slovensko a Ukrajina.

Na základe úspechu predchádzajúcich pilotných projektov EÚ sa konzorcium snaží rozšíriť svoje úsilie o zvýšenie povedomia o židovských cintorínoch, začleniť ich do vzdelávacích iniciatív a umožniť miestnym zainteresovaným stranám zachovať tieto finančne neoceniteľné pamiatky. Prostredníctvom intenzívnych výskumných a vzdelávacích aktivít je cieľom projektu vytvoriť komplexné vzdelávacie materiály o židovských cintorínoch v Európe, zapájať miestne komunity a podporovať medzikultúrne porozumenie. Projekt zahŕňa pestrú škálu aktivít vrátane seminárov, webinárov, mládežníckych a umeleckých súťaží, a spolupráce s miestnymi inštitúciami, a mimovládnymi organizáciami [2].



Obr. 1 Logá mimovládnych organizácii podporujúce projekt Deep dive.
Zdroj: [14]

1.1 Interdisciplinarita/ medziodborovosť

Interdisciplinarita sa vzťahuje na integráciu vedomostí, metód a poznatkov z viacerých vedných disciplín alebo študijných odborov s cieľom riešiť zložité otázky alebo problémy, ktoré nemožno primerane pochopiť alebo vyriešiť v rámci hraníc jednej vednej disciplíny. Zahŕňa spoluprácu a komunikáciu medzi odborníkmi z rôznych odborov s cieľom vytvoriť komplexnejšie a ucelenejšie pochopenie konkrétnej témy alebo aktuálneho problému [3]. V kontexte vzdelávania interdisciplinárne prístupy povzbudzujú študentov, aby skúmali prepojenia medzi rôznymi disciplínami, podporujú tak kritické myslenie, kreativitu a schopnosti riešiť náročnejšie problémy. Prelomením tradičných disciplinárnych hraníc je cieľom interdisciplinárneho vzdelávania poskytnúť diferencovanejší a vzájomne prepojený pohľad na svet a pripraviť jednotlivcov na efektívnejšie a inovatívnejšie riešenie komplexných problémov [4]. Celkovo interdisciplinárne prístupy umožňujú jednotlivcom riešiť zložité problémy, podporovať inovácie a zmysluplne prispievať v prepojenom svete formovanom digitálnym pokrokom [5].

Didaktika biológie je výnimočná svojou interdisciplinárnou povahou, keďže sa spája s pedagogikou, prírodnými vedami a ďalšími pedagogickými disciplínami. Táto interdisciplinarita umožňuje študovať nielen samotný obsah a proces vyučovania biológie, ale aj širšie súvisiace faktory, ako sú procesy učenia, psychologické aspekty výučby a sociálna dynamika v triede. Vďaka tomu môže didaktika biológie účinne reagovať na komplexné potreby študentov a prispievať k ich celkovému vzdelávaniu a rozvoju [6,7]. Ako z predošlého textu vychádza didaktika biológie je interdisciplinárna vedná disciplína. Podobne ako spomínaná didaktika biológie je možné za hraničnú vednú (interdisciplinárnu) disciplínu považovať aj didaktiku dejepisu, respektíve didaktiku histórie [8].

1.2 Opis prostredia

Banská Bystrica, je domovom mnohých kultúrnych a historických pamiatok, vrátane židovského cintorína.

Podľa historických záznamov sa prví židovskí osadníci objavili na území Zvolenskej župy v Radvani, kde ich na svojich pozemkoch usadila šľachtická rodina Radvanských. V roku 1856 bolo v Radvani zaznamenaných 30 židov, pričom v celej Zvolenskej župe ich v tom istom roku žilo len 58 židov. Tento nízky počet obyvateľov sa vysvetľuje zákonmi z 13 storočia, ktoré im bránili v účasti na verejnom živote [9].

Jedinou zachovanou pamiatkou na židovskú komunitu v Radvani je tento cintorín. Židia v Radvani zastávali ortodoxný smer judaizmu, čo dokazujú hebrejské nápisy na ich náhrobných kameňoch. Tento cintorín je umiestnený v lokalite Radvaň na ulici Okružná 44, 97404 (48.7257794354925, 19.127591899995096). Jeho oplotenie, zachované náhrobky a brána zdobená symbolom Davidovej hviezdy (Obr. 2, 3) sú svedkami minulosti a kultúry, ktorá by mala byť zachovaná aj ďalším generáciám.



Obr. 2 Vstupná brána na židovský cintorín v mestskej časti Radvaň, so symbolom Davidovej hviezdy.
Autor: Zuzana Martinková



Obr. 3 Vnútorný areál židovského cintorína v mestskej časti Radvaň.
Autor: Autor

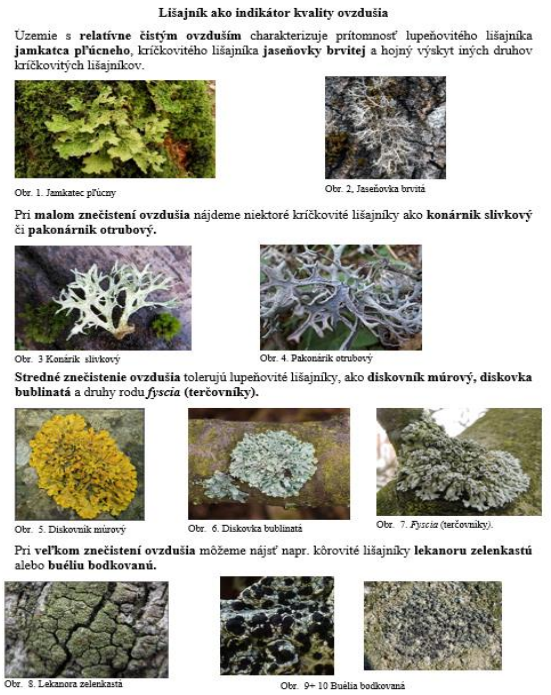
1.3 Metodika

Metodika tejto edukačnej iniciatívy sa opiera o trojfázový prístup, ktorý zahŕňa informačné stretnutie na základnej škole, laboratórne cvičenia vo forme workshopov na univerzite a realizácia vyučovania v terénne na historickom židovskom cintoríne v Banskej Bystrici s využitím pracovných listov. Táto séria aktivít, bola zrealizovaná v období od marca do mája roku 2023.

Pri tvorbe pracovných listov a podkladov pre laboratórne cvičenia sme vychádzali z charakteristiky vzdelávacích oblastí „Človek a príroda“ a „Človek a spoločnosť“ ktoré sú obsiahnuté v Ktoré sú obsiahnuté v Inovovanom Štátnom vzdelávacom programe pre 2. stupeň základných škôl – ISCED 2.

Na prvom stretnutí, ktoré sa konalo 06.03.2023 v priestoroch ZŠ s MŠ Radvanská 1, bolo 12 žiakov oboznámených s našimi stanovenými cieľmi a realizáciou. Študentom vysokej školy bol predstavený krúžok Roots & Shoots a jeho ciele. Roots & Shoots je medzinárodný environmentálny a humanitárny program, založený Dr. Jane Goodall v roku 1991. Jeho cieľom je motivovať a zapájať mládež do projektov na ochranu životného prostredia, udržateľnosti a humanitárnej pomoci [10]. Úvodné stretnutie trvalo 60 minút.

Druhé stretnutie sa uskutočnilo v priestoroch Katedry biológie, ekológie a životného prostredia, Fakulty prírodných vied univerzity Mateja Bela, kde žiaci druhého stupňa mali príležitosť zúčastniť sa laboratórnych cvičení a aktivít realizovaných študentami vysokej školy vo forme workshopov. Stretnutie sa uskutočnilo 14.03.2023 a zúčastnilo sa ho 10 žiakov. Počas 120 minút tu mali možnosť pozorovať hýfy drevokazných húb pod mikroskopom, zoznámiť sa s druhmi drevokazných húb, mali možnosť pozorovať trvalé preparáty machu a určovanie jednotlivých anatomických častí machorastov a rastlín, a tak získať dôležité informácie o biodiverzite, ktorú môžu pozorovať na židovskom cintoríne. Taktiež žiakom pomocou výkladu a diskusie bolo vysvetlené možné využitie lišajníkov ako bioindikátorov. Každý žiak si odniesol zjednodušený kľúč, ktorý aplikuje na poslednom stretnutí a identifikuje kvalitu ovzdušia (Obr. 4). Tieto cvičenia a materiál im poskytli základné znalosti a schopnosti, ktoré zužitkujú pri práci v teréne.



Obr. 4 Zjednodušení kľuč na identifikáciu kvality ovzdušia.
Zdroj: [11] úprava Autor

Posledné stretnutie sa uskutočnilo 03.05.2023 priamo na historickom židovskom cintoríne v Radvani, ktorého sa zúčastnilo 13 žiakov. Žiaci pracovali s nami vytvorenými pracovnými listami po dobu 3 vyučovacích hodín teda 135 minút.

Formy vyučovania zahŕňali praktické cvičenia a terénne práce, ktoré umožnili žiakom aktívne zapojiť sa do procesu učenia. Využívali sme rôzne didaktické metódy, ako je výklad, diskusia, demonštrácia a brainstorming, aby sme zabezpečili rôznorodosť a zaujímavosť vyučovania. Snažili sme sa dodržiavať didaktické zásady, ako je vedeckosť, primeranosť a názornosť, aby sme zabezpečili efektívne a zmysluplné vzdelávanie žiakov [6,7].

2 Výsledky a diskusia

Aby sa nám podarilo naplniť časť jedeného z našich cieľov „Realizácia interdisciplinárneho vyučovania žiakov druhého stupňa základnej školy na historickom cintoríne“. Žiaci museli získať základné informácie o biodiverzite, ktorú môžu pozorovať na židovskom cintoríne. Druhé stretnutie, ktoré sa uskutočnilo v priestoroch Katedry biológie, ekológie a životného prostredia Fakulty prírodných vied univerzity Mateja Bela (Obr. 5,6), bolo jedným z kľúčových momentov. Žiaci druhého stupňa základnej školy sa na ňom aktívne zúčastnili a prejavili veľký záujem o nami pripravené aktivity, ktoré aplikovali pri našom finálnom stretnutí.

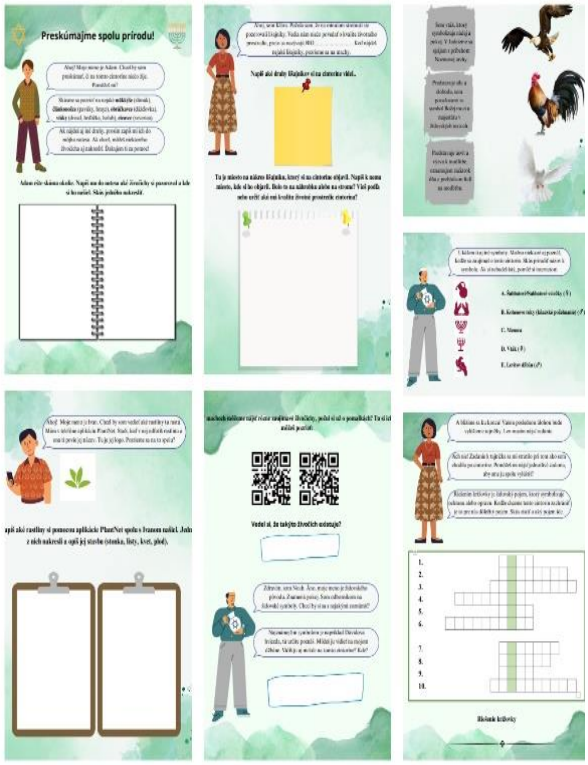


Obr. 5 Žiaci ZŠ s MŠ Radvanská 1. pri návšteve laboratória KBE, FPV UMB.
Autor: Zuzana Martinková



Obr. 6 Žiaci ZŠ s MŠ Radvanská 1. pri návšteve laboratória KBE, FPV UMB.
Autor: Zuzana Martinková

Potom ako žiaci získali základné informácie sme mohli dokončiť ďalšiu časť nami stanoveného druhého cieľa teda: „aplikácia vytvorených pracovných listov“. Tu sa opätovne však musíme vrátiť k nášmu vopred stanovenému cieľu, ktorý sa súčasne prelínal a čiastočne vychádzal z projektu Deep dive: „Vytvorenie edukačných materiálov vo forme pracovných listov, ktoré kombinujú vyučovacie predmety biológia a dejepis“. Tento cieľ sa nám podarilo naplniť (Obr. 7,8).



Obr. 7 Náhľad pracovných listov, ktoré kombinujú vyučovacie predmety biológia a dejepis
Autori: Autori

Obr. 8 QR kód s internetovým odkazom na pracovné listy.
Autori: Autori

Exkurzie, terénne práce a vychádzky predstavujú formu vyučovania, ktorá spojuje teoretickú a praktickú stránku výučby. Žiaci majú pri týchto aktivitách možnosť sledovať prírodniny a prírodné javy v ich prirodzenom prostredí alebo v umelo vytvorených podmienkach (zoologické a botanické záhrady). Ich hlavným zámerom je doplniť a upevniť znalosti a zručnosti nadobudnuté počas výučby v školskom prostredí. Pri prírodovedných predmetoch je taktiež dôležité aby si žiaci budovali vzťah k prírode a k životnému prostrediu. Spoznávajú vzťahy medzi organizmami, vzťahy medzi organizmami a ich prostredím, ako aj vplyv človeka na životné prostredie a jeho zásahy, ktoré ovplyvňujú ekologickú rovnováhu [7].

Na prvej strane pracovného listu sa žiaci „zoznámili“ s Adamom, ktorému študenti majú pomôcť preskúmať okolie cintorína, pokúsiť sa nájsť, identifikovať a zakresliť živočíšne druhy, ktoré by sa mohli vyskytovať v skúmanom areáli. Druha strana listu predstaví riešiteľovi Ivana, ktorý im poskytne stručný návod na identifikáciu rastlín pomocou mobilnej aplikácie PlantNet. Opätovne si žiaci identifikované rastliny zaznačia do pracovného listu a taktiež si jednu ľubovoľnú rastlinu aj zakreslia. Anatomicky rozlíšia stonku, list, kvet a plod. Tieto dve úlohy majú u žiakov rozvíjať: pozorovacie schopnosti, kritické myslenie, schopnosť zhodnotiť informácie zo získaných zdrojov, schopnosť aplikovať teoretické poznatky z biológie do praktických situácií, spoluprácu a využívanie moderných technológií na získavanie informácií a riešenie úloh v teréne.

Zaradenie mobilného aparátu do procesu edukácie žiakov, ponúka vo vzdelávaní množstvo výhod. Podporuje konštruktivistické učenie tým, že poskytuje interaktívne, kontextové a flexibilné vzdelávacie príležitosti, čím zvyšuje zapojenie a motiváciu študentov. Podporuje spoluprácu, aktívne učenie a autonómiu študentov, čím prináša revolúciu do tradičnej paradigmy učenia. Popri týchto výhodách však vznikajú aj nástrahy spojené so začlenením mobilného telefónu do vyučovacieho procesu. Výšia miera rozptýlenia, digitálna nerovnosť, bezpečnostné riziká a technické problémy predstavujú prekážky efektívnej implementácie. Okrem toho je potrebné riešiť otázky týkajúce sa nadmernej závislosti od technológie. Napriek týmto prekážkam môžu proaktívne opatrenia, ako je príprava učiteľov, starostlivé plánovanie a technologická podpora, zmierniť nevýhody a maximalizovať potenciál, a možné výhody začlenenia mobilu do vzdelávania [12].

Na nasledujúcej strane nás Klára informuje o lišajníkoch, ktoré nám môžu poslúžiť ako bio-indikátory kvality ovzdušia. Žiaci sa pokúsia vyhľadať a determinovať druhy lišajníkov a zároveň uviesť aj do listov kde ich bolo možné lokalizovať. Následne podľa zjednodušeného kľúča (Obr. 4) sa pokúsia určiť akú

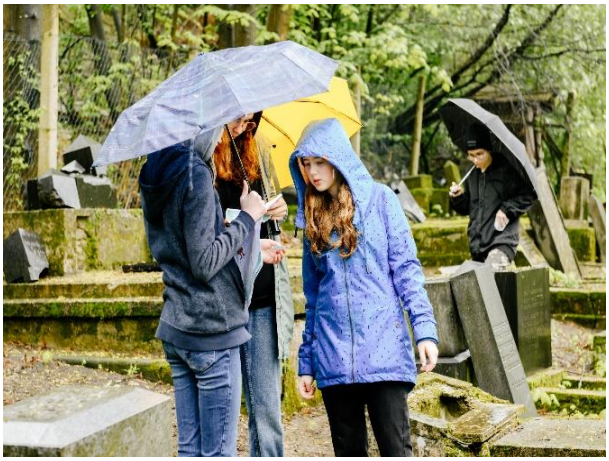
kvalitu ma ovzdušie v danej lokalite. Študenti na nasledujúcej strane majú QR kód, ktorý nadväzuje na mach a na drobné bezstavovce v ňom žijúce. Označujeme ich ako pomalky alebo tardigrady (*Tardigrada).*

Na totožnej strane je predstavený aj posledný sprievodca týmto pracovným listom Noah. Stručným úvodom sa presúvame k symbolom judaizmu. Žiaci majú na náhrobkoch a v areáli cintorínu vyhľadať najčastejšie židovské symboly. Nasleduje úloha kde študenti majú priradiť vtáky (orol, kohút, holubica) k ich vyobrazeniu a textu, ktorý sa viaže na symboliku odzrkadlenú v posvätnom zvitku pre vyznávačov judaizmu, Tóre.

Predposledná strana je ešte venovaná opätovne symbolom judaizmu, s ktorými sa môžu žiaci stretnúť na náhrobkoch pri preskúmavaní cintorínu. Jednotlivé špecifické symboly na náhrobkoch nám môžu niečo prezradiť o zosnulom aj napriek neznalosti hebrejského jazyka. Po správnom priradení sa žiaci pokúšajú identifikovať, nájsť spomenuté symboly. Predposledná úloha znova využíva multimediálne prepojenie pomocou QR kódu, ktorý nám pri spustení prehrá typické zvuky vtákov, ktoré by sa na cintoríne mohli objaviť. Žiaci sa po vypočutí utíšia a snažia sa identifikovať jednotlivé druhy vtákov.

Posledná úloha je tajnička kde žiaci zosumarizujú svoje nadobudnuté vedomosti. Najskôr však musia vyhľadať otázky k tajničke, ktoré sú jednotlivo, náhodne rozmiestnene v celom objekte. Výsledné slovné spojenie je pojem „*tikkun olam*“ alebo oprava sveta. Moderná židovská teológia sa zameriava na Tikun Olam. Tento koncept zdôrazňuje spoluprácu ľudí s Bohom na zlepšovaní sveta. Je to silná metafora, ktorá nám pripomína našu zodpovednosť za stav sveta, ktorý sme svojím nevedomím, chamtivosťou a egoizmom poškodili. Teraz je na nás, aby sme to napravili, pretože nikto iný to za nás neurobí [13].

Po vypracovaní pracovných listov sme dokázali naplniť náš druhý stanovený cieľ teda: Realizácia interdisciplinárneho vyučovania žiakov druhého stupňa základnej školy na historickom cintoríne a aplikácia vytvorených pracovných listov (Obr. 9,10,11).



Obr. 9 Využitie pracovných listov na židovskom cintoríne.
Autor: Zuzana Martinková



Obr. 10 Využitie pracovných listov na židovskom cintoríne.
Autor: Zuzana Martinková



Obr. 11 Účastníci stretnutia na historickom židovskom cintoríne v Radvani .
Autor: Zuzana Martinková

Žiaci prejavili veľký záujem o aktivity a vykazovali vysokú úroveň angažovanosti. Ich pozornosť a záujem sa prejavovali nielen voči informáciám, ktoré im poskytli učitelia a budúci učitelia, ale aj voči objavom na historickom židovskom cintoríne. Počas terénnych prác sa študenti aktívne zapájali do hľadania a identifikácie rôznych druhov rastlín, živočíchov a symbolov, čím prejavili svoje schopnosti. Taktiež aplikovali nadobudnuté vedomosti z vyučovacích hodín a z druhého stretnutia, ktoré sa konalo v laboratóriách KBE, UMB (Obr. 5,6).

Účastníci vyučovania sa aktívne zapájali aj pokladaním otázok a vyjadrovaním svojich myšlienok a názorov, čo svedčí o ich záujme a angažovanosti o danú problematiku. Žiaci preukázali vysokú úroveň zapojenia, zvedavosti a spolupráce počas všetkých našich stretnutí, čo svedčí nielen o ich schopnostiach v oblasti biológie a histórie, ale aj o ich nadšení a záujme o tieto témy. Ich reakcie a aktívna účasť prispeli k pozitívnemu vzdelávaciemu zážitku a úspešnej realizácii našich iniciatív.

Je dôležité taktiež uviesť, že my študenti vysokej školy sme sa pripojili už do rozbehnutého projektu organizovaného na ZŠ s MŠ Radvanská 1. Tento projekt mal za cieľ upraviť prostredie cintorína a osadiť na ňom informačnú tabuľu so základnými historickými a prírodopisnými údajmi o cintoríne (Obr. 12). Spomínaná informačná tabuľa sa nachádza pred vstupnou bránou židovského cintorínu v mestskej časti Radvaň. Okrem primárneho spektra, teda vzdelávania, mal projekt aj dôležitý solidárny význam pre miestnu židovskú komunitu.



Obr. 12 Informačná tabuľa pred vstupnou bránou židovského cintorína v Radvani.
Zdroj: Autor

Záver

Využitie historického židovského cintorína v procese vyučovania biológie predstavuje inovatívny prístup, ktorý spája zachovanie kultúrneho dedičstva s modernými vzdelávacími metódami. Seria vzdelavacích aktivít bola realizovaná žiakmi druhého stupňa Základnej školy s materskou školou Radvanská 1, v rámci krúžku Roots & Shoots demonštruje, ako je možné integrovať historické miesta do vyučovacieho procesu a zároveň podporovať interdisciplinaritu a praktické vzdelávanie.

Takéto vyučovanie zdôrazňuje dôležitosť interdisciplinárneho prístupu vo vzdelávaní, ktorý umožňuje prepojiť rôzne oblasti poznania a aplikovať ich v praxi. Židovský cintorín v Banskej Bystrici, s bohatou históriou a kultúrnym dedičstvom, sa stal živou učebnicou pre študentov, ktorí mali možnosť nielen spoznať biologické koncepty v prírodnom prostredí, ale aj objavovať historické a kultúrne súvislosti spojené so židovskou komunitou. Nami zvolené metódy, sa ukázali ako efektívne spôsoby, ktoré podporujú aktívne zapojenie žiakov, spoluprácu a riešenie reálnych problémov. Študenti mali možnosť skúmať a identifikovať živočíchy a rastliny, ktoré sa v danej lokalite vyskytovali. Zároveň sa mali oboznámiť s historickými symbolmi a tradíciami. Implementácia mobilných technológií prostredníctvom QR kódov a mobilných aplikácií ako PlantNet poskytla študentom interaktívne a kontextové vzdelávacie prostriedky, čím podporila ich zapojenie a motiváciu k riešeniu pracovných listov. Dôležitosť využitia interdisciplinárneho prístupu, umožnila študentom prepojiť poznatky z biológie s historickým a kultúrnym kontextom.

Celkové pozitívne výsledky tejto iniciatívy svedčí o dôležitosti inovatívnych vyučovacích metód a ich vplyvu na vzdelávací proces. Integrácia historických miest do vyučovania nielen obohacuje učebný obsah, ale aj podporuje rozvoj kritického myslenia, spolupráce a uvedomovania si zodpovednosti voči kultúrnemu dedičstvu a životnému prostrediu.

Poďakovanie

Touto cestou by som chcel poďakovať mojej školiteľke Mgr. Marcele Adamcovej, PhD. za odborné rady, pripomienky a odbornú pomoc pri tvorbe tohto príspevku a možnosť sa participovať na týchto

aktivitách. Taktiež by som chcel poďakovať aj za ochotu, čas, trpezlivosť, pochopenie a ľudský prístup. Následne moja vďaka patrí vyučujúcim a vedúcim krúžku na ZŠ s MŠ Radvanská 1, PaedDr. Zuzane Krúpovej, PhD. a Mgr. Márii Šajgalíkovej. Taktiež moja vďaka patrí vedúcej oddelenia školského úradu. školstva a mládeže v Banskej Bystrici, PhDr. Jane Odrobiňákovej, vďaka ktorej tento projekt bol pridelený Univerzite Mateja Bela v Banskej Bystrici. Taktiež chcem poďakovať aj predsedovi Židovskej náboženskej obci so sídlom v Banskej Bystrici Ing. Jaromírovi Woltovi, ktorý nám umožnil realizáciu interdisciplinárneho vyučovania na uvedenom cintoríne. A nemôžem opomenúť všetkých účastníkov, riešiteľov, žiakov ZŠ s MŠ Radvanská 1.

Použitá literatúra

[1] HEGEDIŠ, P. J., HUS, V. 2020. Cemetery as an Opportunity for Learning outside the Classroom. In Creative Education, vyd. 11, s. 2660-2671. 2020. dostupné na internete: 10.4236/ce.2020.1112197

[2] LICHTENSTEIN, R. 2023. Deep dive report: testing model concepts in Jewish cemeteries in Eastern Europe 2022-2023. Project Report. The Foundation for Jewish Heritage. ISBN 978-3-00-075788-4.

[3] MULDER, M. 2012. Interdisciplinarity and education: towards principles of pedagogical practice. The Journal of Agricultural Education and Extension. vyd. 18. s. 437-442. 2012. dostupné na internete: 10.1080/1389224X.2012.710467

[4] CHETTIPARAMB, A. 2007. Interdisciplinarity: a literature review. The Interdisciplinary Teaching and Learning Group, Subject Centre for Languages, Linguistics and Area Studies, School of Humanities, University of Southampton, 2007. ISBN: 978-1-905788-36-1.

[5] NEWELL. H. W., KLEIN, T, J. 1996. Interdisciplinary studies into the 21st century. In The Journal of General Education, Penn State University Press, vyd. 45. č. 2. s. 152-169. 1996. dostupné na internete: jstor.org/stable/27797297

[6] KIMÁKOVÁ, K. 2022. Sprievodca didaktikou biológie. 1. vyd. Košice: Vydavateľstvo ŠafárikPress, 2022. ISBN 978-80-574-0105-6.

[7] PAVLASOVÁ, L. 2014. Přehled didaktiky biologie. Univerzita Karlova v Praze: Pedagogická fakulta. 2014. ISBN 978-80-7290-643-7.

[8] KMEŤ, M. 2018. História a dejepis. 2. vyd. Žilina: IPV Inštitút priemyselnej výchovy, 2018. ISBN 978-80-8990-211-8.

[9] Nižňanský, E., Lônčíková, M. 2016. Dejiny židovskej komunity v Banskej Bystrici. 1. vyd. Banská Bystrica: Židovská náboženská obec so sídlom v Banskej Bystrici, 2016. ISBN 978-80-89127-23-8.

[10] Jane Goodall Institute Roots & Shoots. [online]. Rootsandshoots: [cit.29.2.2024]. Dostupné na internete: https://rootsandshoots.global/

[11] KAHAN, J. 2013. Lišajníky. 1. vyd. Bratislava: Strom života, 2013. ISBN 978-80-88688-69-3

[12] CRIOLLO-C, S. a kol. 2021. Mobile Learning Technologies for Education: Benefits and Pending Issues. In Applied Sciences, vol. 11, no. 9: 4111. Dostupné na internete: 10.3390/app11094111

[13] TROSTER, L. 2004. Repairing the Order of Creation: A Jewish Perspective on Environmental Ethics. In Environmental Practice, vol. 6, no. 1, pp. 2-6. Dostupné na internete: 10.1017/s146604660400002x

Zdroj obrázky:

[14] https://www.jewishcemeteries.eu/

Špecifiká migrácie zo severnej Afriky do Európskej únie

Specifics of migration from North Africa to the European Union

Boris Brath[1]
Školiteľ: Miroslava Trembošová[1]
[1]Katedra geografie, geoinformatiky a regionálneho rozvoja,
FPVaI UKF, Tr. A. Hlinku 1, 949 84 Nitra,
boris.brath@student.ukf.sk, mtrembosova@ukf.sk

Abstrakt

Tento článok sa zaoberá špecifikami migrácie zo severnej Afriky do Európskej únie, vyzdvihujúc kľúčové aspekty tohto komplexného fenoménu. Analyzujeme faktory migrácie a následky migrácie. Venujeme sa aj migračnej politike Európskej únie a jej účinnosti pri riadení prílevu migrantov a taktiež sa zameriame na migračné trasy cez Stredomorie od prelomového roku 2015. Cieľom je poskytnúť čitateľom komplexný pohľad na problematiku migrácie medzi severnou Afrikou a Európskou úniou, stručnú demografickú charakteristiku regiónu severnej Afriky, analýzu migračných tokov z jej územia do EÚ a príčiny, a následky migrácie.

Kľúčové slová: geopolitika, migrácia, sociokultúrne vplyvy, severná Afrika, Európska únia

Abstract

This article addresses the specifics of migration from North Africa to the European Union, highlighting key aspects of this complex phenomenon. We analyze migration factors and the consequences of migration. We also delve into the migration policy of the European Union and its effectiveness in managing the influx of migrants, focusing on migration routes across the Mediterranean since the pivotal year 2015. The aim is to provide readers with a comprehensive overview of the migration issue between North Africa and the European Union, a brief demographic characterization of the North African region, an analysis of migration flows from its territory to the EU, and the causes and consequences of migration.

Key Words: geopolitics, migration, sociocultural influences, North Africa, European Union

Úvod

Migrácia zo severnej Afriky do Európskej únie (ďalej len „EÚ“) predstavuje naliehavý a komplexný fenomén, ktorý ovplyvňuje nielen životy tisícov jednotlivcov, ale aj geopolitickú a sociálnu dynamiku dvoch susediacich regiónov. Zameriavame sa na dôležitosť porozumenia faktorov, ktoré formujú a riadia migráciu. Špeciálny dôraz bude venovaný migračným cestám, ktoré prechádzajú cez Stredomorie. Tento pohľad na problematiku migrácie poskytne čitateľom lepšie pochopenie komplexnosti tejto témy a dôležitosť hľadania udržateľných a humánnych riešení v tejto oblasti. Taktiež chceme zdôrazniť, že región severnej Afriky môžeme chápať aj ako tranzitný región vzhľadom na to, že do toho regiónu migrujú obyvatelia z južných štátov afrického kontinentu.

Migrant je človek, ktorý sa prisťahoval do určitej územnej jednotky – imigrant (prisťahovaný) alebo sa z určitej územnej jednotky vysťahoval - emigrant (vysťahovaný), pričom opustili svoje zákonné alebo registrované bydlisko v krajine pôvodu [1]. S termínom „migrant“ súvisí aj termín utečenec, ktorého „dohovor definuje ako osobu, ktorá sa nachádza mimo svojho štátu alebo na jeho území, ktorá ma oprávnené obavy pred prenasledovaním z dôvodov rasových, náboženských, národnostných, príslušnosti k určitej sociálnej skupine alebo zastávania určitých názorov“[2].

1 Metódy a postupy

Pri spracovaní tohto článku sme ako prvú použili metódu zhromažďovania informácií a dát z 23 zdrojov. Pomocou metódy vysvetľujúceho opisu sme zanalyzovali jednotlivé migračné prúdy zo severnej Afriky do EÚ. Využili sme štatistické a matematické metódy v podobe tabuliek a grafov. Následne nám poslúžili kartografické zručnosti na zobrazenie aktuálnej situácie v regióne.

Na základe osobnej konzultácie s pánom doc. Krogmannom sme si zadefinovali, ktoré štáty tvoria predmetný región.

2 Výsledky a diskusia

V tejto kapitole si opíšeme dosiahnuté výsledky a porovnáme ich so stanovenými cieľmi.

2.1 Vymedzenie územia

Región severnej Afriky kontexte našej práce tvorí 6 štátov: Alžírsko, Tunisko, Maroko, Západná Sahara, Líbya a Egypt. Geografické súradnice tohto regiónu sú približne 22° s. g. š. až 37° s. g. š a 17° z. g. d. až 35° v. g. d. Veľkosť tohto regiónu je o veľkosti vyše 6 000 000 km², kde v roku 2022 žilo viac ako 231 miliónov obyvateľov – 14,96% z celkového počtu obyvateľov všetkých afrických štátov. Hustota osídlenia je 295,37 obyv./1 km² (tab. 3). Najväčšiu rozlohu má Alžírsko, najmenšiu Tunisko (tab. 1), najľudnatejšou krajinou študovaného regiónu je Egypt a naopak najmenej obyvateľov má Západná Sahara (tab. 2).

Pre lepšiu predstavu regiónu severná Afrika nám môže poslúžiť mapa 1.

Tab. 1 Rozloha jednotlivých štátov severnej Afriky v roku 2022

Názov štátu	Rozloha (km^2)	%
Alžírsko	2 381 741	39,57
Egypt	1 001 450	16,64
Líbya	1 759 540	29,23
Maroko	446 550	7,42
Tunisko	163 610	2,72
Západná Sahara	266 000	4,42
SPOLU	**6 018 891**	**100,00**

Zdroj: [3], [4], [5]

Tab. 2 Počet obyvateľov jednotlivých štátov severnej Afriky v roku 2022

Názov štátu	Počet obyvateľov	%
Alžírsko	44 903 225	21,06
Egypt	110 990 103	52,06
Líbya	6 812 341	3,20
Maroko	37 457 971	17,57
Tunisko	12 356 120	5,80
Západná Sahara	673 632	0,32
SPOLU	**213 193 392**	**100,00**

Zdroj: [3], [4], [5]

Tab. 3 Hustota obyvateľstva jednotlivých štátov severnej Afriky v roku 2022

Názov štátu	Hustota obyvateľstva (obyv./km^2)	%
Alžírsko	18,84	6,38
Egypt	110,80	37,51
Líbya	3,87	1,31
Maroko	83,85	28,39
Tunisko	75,48	25,55
Západná Sahara	2,53	0,86
SPOLU	**295,37**	**100,00**

Tab. 4 Národnosti, jazyky a náboženstvá jednotlivých štátov severnej Afriky

Názov štátu	Národnosti	Jazyky	Náboženstvá
Alžírsko	Alžírčania Berberi Saharawi	Arabčina Berberčina	Islam
Egypt	Kopti Núbijcovia Bahájovia Židia	Arabčina	Islam Koptské kresťanstvo
Líbya	Berberi Tuaregovia	Arabčina Berberčina	Sunnitský islam
Maroko	Berberi Saharawi Židia	Arabčina Berberčina Francúzština	Sunnitský islam
Tunisko	Tunisania Berberi Židia	Arabčina Francúzština Berberský dialekt	Sunnitský islam
Západná Sahara	Arabi Berberi	Arabčina Francúzština	Sunnitský islam

Zdroj: [6], [7]

Podľa kultúrnych znakov populácie majú najväčšie zastúpenie Arabi a Berberi. Majoritným náboženstvom je islam, jeho menej radikálna sunnitská odnož.

2.2 Migrácia

Pôvod slova *migrácia* sa odvodzuje z latinského jazyka a zahrňuje rôzne významy, vrátane sťahovania, pohybu, presunu, premiestnenia a presídľovania. Taktiež sa využíva na opis sťahovania národov [8].

Bolečeková [8] píše, že migrácia obyvateľstva je jav, kedy ľudia opúšťajú svoje trvalé alebo dočasné bydlisko a presídľujú sa za hranice územia, či už na trvalo alebo na obmedzenú dobu. V súčasnej dobe sa migrácia považuje za neoddeliteľnú súčasť globalizačných trendov. Do popredia sa dostáva aj termín medzinárodná migrácia. Výraz "medzinárodná migrácia" označuje presun cez hranice štátov, čo znamená, že jednotlivci alebo skupiny ľudí opúšťajú jednu krajinu a usídľujú sa v inej [9].

Krogmann a Bilic [1] chápu migráciu ako základný ukazovateľ demografickej dynamiky, ktorý poukazuje na premiestňovanie obyvateľstva v čase a priestore a je súčasne aj základným údajom modelovania prognóz veľkosti a rozvoja každého územného celku.

V zmysle členenia, ktoré zadefinovali Bilic a Krogmann [1] môžeme aplikovať na našu problematiku všetky uvedené typy migrácie. To znamená, že obyvatelia migrujú zo štátov severnej Afriky – stávajú sa **emigrantmi**; emigranti sa adaptujú v už osídlených územiach – sekundárna migrácia; pri migrácii zo severnej Afriky môžeme hovoriť o dobrovoľnej migrácii, ale aj o nútenej migrácii; emigranti presahujú hranice štátu to znamená, že ide aj o zahraničnú migráciu; emigranti si menia bydlisko – trvalá migrácia; emigranti migrujú za vidinou lepších ekonomických podmienok a zároveň aj migrujú kvôli politickým, rodinným, národnostným a iným príčinám – mimoekonomická migrácia; taktiež ide aj o trvalú migráciu z hľadiska takého, že migranti sa plánujú usadiť v hostiteľských krajinách; pri migrácii z hľadiska kritéria početnosti migrujúcich osôb môžeme uplatniť všetky typy. V poslednom rade ide predovšetkým o nelegálnu migráciu – emigranti nerešpektujú právne nariadenia jednotlivých štátov (EÚ).

Rok 2015 predstavoval vrchol európskej migračnej krízy, ktorú charakterizoval nárast výrazného počtu nelegálnych prekročení Schengenských hraníc. Podľa správy agentúry Frontex Risk Analysis for 2016 [10], bolo v roku 2015 odhalených vyše 1 800 000 prípadov nezákonných prekročení vonkajšej hranice EÚ, čo predstavuje viac než 6 násobok oproti roku 2014. Jedna z hlavných migračných ciest bola centrálna stredomorská cesta, a súbežne s ňou je významná suchozemská cesta v španielskych enklávach Ceuta a Melila v severoafrickom Maroku. [10].

Migranti zo severnej Afriky využívajú na transport do Európy Stredozemné more vzhľadom na to, že severné hranice severnej Afriky sú jasne definované na západe a severe prítomnosťou Atlantického oceánu a Stredozemného mora [11].

2.3 Faktory migrácie

V oblasti migrácie sa identifikujú tzv. "push faktory", ktoré predstavujú dôvody, prečo ľudia opúšťajú svoju krajinu, a "pull faktory", ktoré sú dôvodmi, prečo sa rozhodujú presťahovať do konkrétnej hostiteľskej krajiny.

Tieto faktory možno ďalej kategorizovať do troch skupín: socio-politické, demografické, ekonomické a environmentálne [12].

Tab. 5 Faktory – charakteristika a dopady

Faktory	Charakteristika	Dopady
Socio-politické	Náboženské, rasové, politické alebo kultúrne prenasledovanie Vojny	Hlad Chudoba Násilie Utrpenie Porušovanie ľudských práv
Demografické	Nízke pracovné štandardy Vysoká nezamestnanosť Zlý hospodársky stav krajiny	Korupcia Emigrácia kvalifikovaných pracovníkov Znížená pôrodnosť
Ekonomické		
Environmentálne	Klimatické zmeny – *environmentálni migranti*	Znečistená voda Znečistené potraviny Devastácia pôdy Dezertifikácia

Zdroj: [12], upravil: autor

Environmentálni migranti/klimatickí utečenci sú jednotlivci alebo skupiny ľudí, ktorí sú nútení opustiť svoje domovy v dôsledku extrémnych klimatických podmienok alebo environmentálnych zmien, ktoré vážne ovplyvňujú ich životné prostredie. Tento pojem sa vzťahuje na ľudí, ktorí sú nútení migrovať v dôsledku stúpajúcej úrovne morí, dlhotrvajúcej sucho, extrémnych poveternostných udalostí alebo iných environmentálnych faktorov spojených so zmenou klímy.

Podľa odhadov Svetovej banky sa očakáva, že do roku 2050 počet ľudí nútených migrovať v dôsledku klimatických zmien vzrastie na viac ako 143 miliónov po celom svete [13].

2.4 Následky migrácie

S migráciou sú neodlučiteľne spojené jej následky – pozitívne alebo negatívne, ktoré vplývajú na ekonomické, demografické, sociálne a politické aspekty nielen v prijímajúcich krajinách ale aj v pôvodných krajinách.

Pozitívne následky migrácie môžu byť napr. finančný a ekonomický rast; migranti môžu byť potenciálni daňoví poplatníci. Negatívne následky migrácie môžu byť napr. pri nelegálnej migrácie môžu byť zlé nehygienické pracovné podmienky s nízkymi mzdami a nízkou životnou úrovňou; nelegálni migranti môžu spotrebúvať zdroje národa; o možnosti zamestnania môžu súperiť migranti a miestni obyvatelia [14].

Tab. 6 Kultúrne odlišnosti migrantov zo severnej Afriky

Kultúrne odlišnosti	
Jazyk a komunikácia	Arabský jazyk, berberské jazyky, francúzština
Náboženské hodnoty	Islam – islamské náboženské hodnoty a praktiky
Kultúrne udalosti a slávenia	Islamské sviatky – RAMADAN Arabské tradičné festivaly
Hudba a tanec	Tradičná hudba a tanec – GNAWA (Maroko); RAI (Alžírsko)
Umenie	Tradičné umenie – mozaiky, keramika, tradičná arabská kaligrafia

Zdroj: [6], upravil: autor

V tabuľke č. 6 môžeme vidieť jednotlivé kultúrne odlišnosti migrantov zo severnej Afriky. Tieto odlišnosti si migranti „prinášajú“ do jednotlivých krajín Európskej únie.

Miestne obyvateľstvo sa môže brániť prijímaniu a presvedčeniu migrantov, čo môže vyústiť do diskriminácie. Nedostatočná spoločenská akceptácia zraniteľnejších migrantov môže viesť k nezákonným a kriminálnym aktivitám, narušujúc sociálnu štruktúru miesta [14].

2.5 Migračná politika EÚ

Štáty EÚ zvyšujú snahu o vytvorenie efektívnej, ľudskej a bezpečnej migračnej politiky v Európe. V tejto iniciatíve zohráva kľúčovú rolu Európska rada tým, že stanovuje strategické priority [15].

Podľa posledných štatistík najvyššiu mieru prijatia migrantov vykazuje Taliansko a Grécko (tab. 7).

Tab. 7 Prítomnosť migrantov vo vybraných krajinách EÚ v roku 2024

Pr. č.	**Krajina EÚ**	**Abs.**	**%**
1.	Taliansko	138 721	78,44
2.	Grécko	35 839	20,27
3.	Slovinsko	1 274	0,72
4.	Chorvátsko	581	0,33
5.	Rumunsko	434	0,25
SPOLU		**176 849**	**100,00**

Zdroj: [16], upravil: autor

Je veľmi dôležité si uvedomiť, že nie všetci migranti dostanú v prijímajúcich krajinách **azyl**.

Azyl je právne uznávaný štátny status, ktorý je udelený jednotlivcovi alebo skupine jednotlivcov, ktorí utekajú pred prenasledovaním, vojnovým konfliktom, násilím alebo iným nebezpečenstvom vo svojej krajine pôvodu.

Podľa dostupných dát najvyššia miera žiadosti o azyl bola v Nemecku takmer 33% (tab. 9), pričom najvyššia miera prvostupňových azylových rozhodnutí na milión osôb vykazovalo Rakúsko (tab. 10), Nemecko je až na 5. mieste. Zrejme to súvisí s nemeckou opatrnosťou.

Tab. 8 Žiadosti o azyl vo vybraných krajinách EÚ v roku 2022

Pr. č.	**Krajina EÚ**	**Abs.**	**%**
1.	Nemecko	243 835	32,42
2.	Francúzsko	156 455	20,80
3.	Rakúsko	112 245	14,92
4.	Španielsko	117 945	15,68
5.	Taliansko	84 290	11,21
6.	Grécko	37 375	4,97
SPOLU		**752 145**	**100,00**

Zdroj: [17], upravil: autor

Tab. 9 Kladné prvostupňové rozhodnutia – na milión osôb vo vybraných krajinách EÚ v roku 2022

Pr. č.	**Krajina EÚ**	**Abs.**	**%**
1.	Rakúsko	1 844	19,31
2.	Grécko	1 840	19,26
3.	Luxembursko	1 615	16,91
4.	Estónsko	1 578	16,52
5.	Nemecko	1 543	16,16

6.	Švajčiarsko	1 131	11,84
SPOLU		**9 551**	**100,00**

Zdroj: [18], upravil: autor

V tabuľke č. 8 a č. 9 sú uvedené údaje, ktoré na stránke neboli bližšie určené z hľadiska konkrétnosti krajiny pôvodu.

Azylové právo EÚ stanovuje výšku mesačnej dávky azylanta, ktorá je variabilná. Najvyššia je práve v Nemecku (tab. 11)

Tab. 10 Mesačné dávky vyplácané azylantom vo vybraných krajinách EÚ z roku 2018

Krajina EÚ	Výška dávku
Nemecko	354€
Taliansko	75€
Švédsko	70€ (+50€/dieťa)
Francúzsko	204 €
Španielsko	50€ (-19€/dieťa) – spoločné ubytovacie jednotky; počas počiatočného šesťmesačného obdobia Od 300€ do 500€ - súkromné ubytovanie
Rakúsko	40€ - štátne bývanie Od 150€ do 200€ - ubytovanie, kde si musia zabezpečiť jedlo Do 200 € - školské potreby pre deti Od 320€ do 365€ - vlastné súkromné ubytovanie
Grécko	90€ - žiadatelia v štátnom bývaní

Zdroj: [19], upravil: autor

2.6 Migračné toky na trase cez Stredomorie

Migranti smerujú do EÚ tromi trasami, západnou, centrálnou a východnou stredomorskou cestou.

Tab. 11 Porovnanie migračných tokov od roku 2015 po rok 2023

Roky	ZST	CST	VST
2015	7 004	153 946	885 386
2016	9 990	181 376	182 277
2017	23 063	118 962	42 319
2018	57 034	23 485	56 561
2019	23 967	14 003	83 333
2020	41 861	35 628	19 681
2021	41 945	67 724	20 567
2022	31 219	105 561	43 906
2023	56 852	157 479	60 073
SPOLU	**292 935**	**858 164**	**1 394 103**

ZST – západná stredomorská trasa; CSC – centrálna stredomorská trasa; VSC – východná stredomorská trasa

Zdroj: [20], upravil: autor

Migračné toky začínajú zo štátov severnej Afriky ako môžeme aj vidieť na mape č. 2. Avšak treba spomenúť, že nie všetci migranti, ktorí začali transport zo štátov severnej Afriky, sú migrantmi alebo teda obyvateľmi štátov severnej Afriky.

Mnohí migranti začínajú migrovať z južných štátov samotnej Afriky ako napríklad Mauritánia, Mali, Nigéria, Čad, Sudán atď. Všetci cestujú na sever odkiaľ následne migračnými cestami smerujú do EÚ. Migranti cestujú napríklad do Maroka a Tuniska. Maroko a Tunisko sú dva najviac susediacich štátov s Európou. Štáty ako sú Alžírsko a Egypt majú rozsiahle hospodárstva, avšak niektoré oblasti týchto krajín stále čelia problémom s nezamestnanosťou, čo vedie k migracii priamo z týchto štátov. Líbya bola v nedávnej minulosti zasiahnutá politickými konfliktmi a vojnou čo spôsobilo hromadnú migráciu obyvateľov. Západná Sahara je oblasť s extrémnymi klimatickými podmienkami, kde suchá a nedostatok vody ovplyvňujú životné podmienky obyvateľov, a preto migrujú.

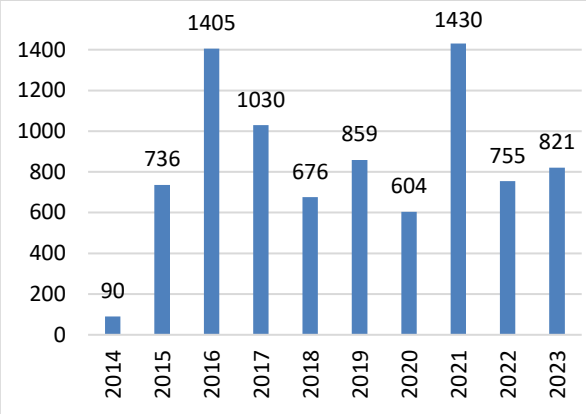
Tab. 12 Top 7 národností (migrantov) afrického kontinentu prichádzajúcich do Európy v roku 2023

Pr. č.	Štátna príslušnosť	Abs.	%
1.	Marocká	29 800	19,32
2.	Neidentifikovaná	27 779	18,00
3.	Senegalská	23 430	15,19
4.	Guinejská	22 833	14,80
5.	Ivoiriens	18 972	12,30
6.	Tuniská	17 970	11,65
7.	Egyptská	13 487	8,74
SPOLU		**154 271**	**100,00**

Zdroj: [21], upravil: autor

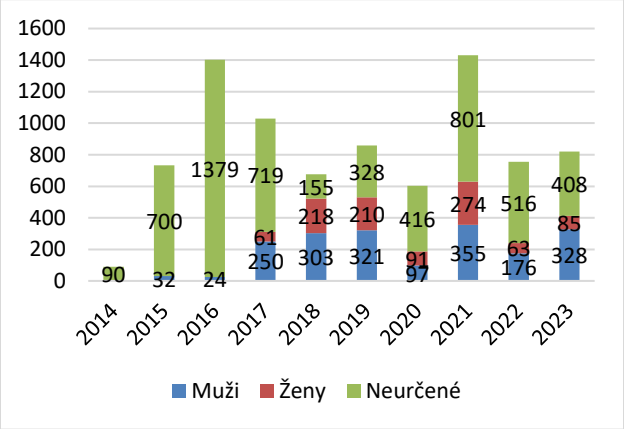
Celkový počet mŕtvych a nezvestných migrantov zo severnej Afriky podľa projektu Missing Migrants od roku 2014 je **8 406.**

Graf 1 Mŕtvi a nezvestní migranti zo severnej Afriky od roku 2014 po rok 2023



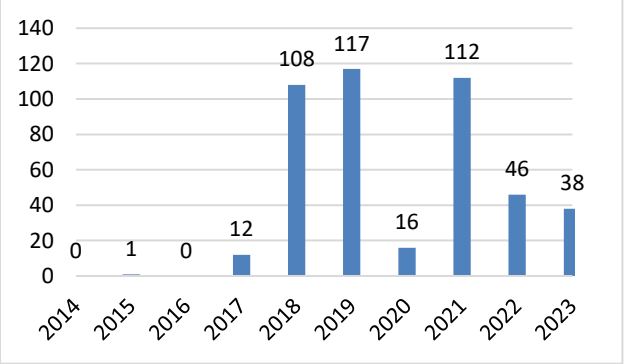
Zdroj: [22], upravil: autor

Graf 2 Mŕtvi a nezvestní migranti zo severnej Afriky podľa pohlavia v rokoch od 2020 do 2023



Zdroj: [22], upravil: autor

Graf 3 Mŕtve a nezvestné detí migrantov zo severnej Afriky v rokoch od 2020 do 2023



Zdroj: [22], upravil: autor

Tab. 13 Príčiny úmrtia migrantov zo severnej Afriky v rokoch od 2020 do 2023

Príčina úmrtia	Počet
Násilie	796
Choroba/nedostatok prístupu k primárnej zdravotnej starostlivosti	513
Náhodná smrť	36
Utopenie	2 289
Nehoda/smrť vozidla spojené s nebezpečnou prepravou	1 146
Tvrdé podmienky prostredia / nedostatok primeraného prístrešia, potravy, vody	1 516
Zmiešané alebo neznáme	2 108

Zdroj: [22], upravil: autor

Záver

Migrácia sama osebe nie je len otázkou presunu ľudí, ale aj spôsobom, ako formovať spoločnosti, kultúry a ekonomiky.

Na základe získaných dát vieme skonštatovať, že za posledný rok (2023) agentúra FRONTEX odhalila **47 307** nelegálnych prekročení hraníc.

Fenomén migrácie sa globálne prehlbuje. Je dôležité poznať aj túto pre Slovensko zatiaľ vzdialenú politicko-ekonomickú problematiku, aby sme mohli pripraviť kvalitnú stratégiu pre migračnú politiku nášho štátu. V kontexte aktuálnej problematiky je nevyhnutné hľadať udržateľné riešenia, ktoré budú brať do úvahy humanitárne hľadisko, záujmy všetkých zainteresovaných strán a dlhodobú perspektívu.

Je nevyhnutné si uvedomiť komplexnosť tohto javu a vyvážene pristupovať k jeho riešeniu v duchu solidarity a vzájomného porozumenia. Vytváranie inkluzívnych politík, ktoré budú rešpektovať práva migrantov a prispejú k ich integračnému procesu, môže byť kľúčom k udržateľnej budúcnosti, kde migrácia nie je len problémom, ale aj príležitosťou pre prosperitu a vzájomné obohatenie.

Poďakovanie

Ďakujem školiteľke pani RNDr. Miroslave Trembošovej, PhD. za jej odborné a vecné pripomienky.

Použitá literatúra

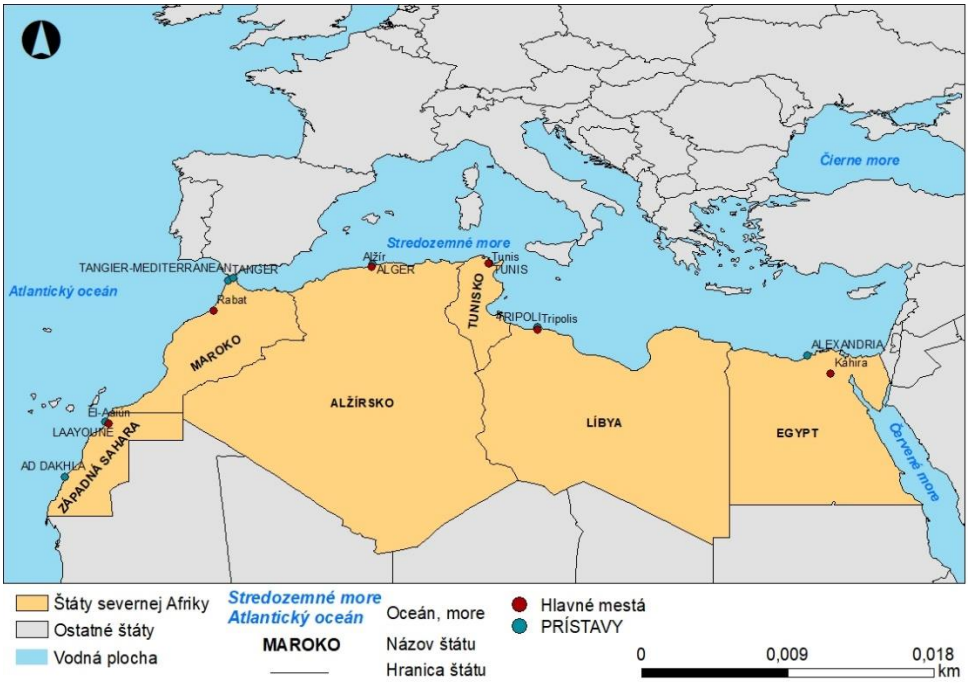
[1] BILIC, M. a KROGMANN, A. Zahraničná migrácia a jej vplyv na obyvateľstvo a krajinu Slovenska. In GURŇÁK, D a CHALUPA, P. Edícia Prírodovedec. Č 611. Nitra: Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, 2015, s. 11 – 35. ISBN: 978-80-558-0870-3

[2] KOVÁČIK, Ján. Utečenci. In ĎURAJKOVÁ, Daniela. Azyl. Bratislava: Metodické-pedagogické centrum Bratislavského kraja v Bratislave, 2006, s. 13-18. ISBN 80-7164-417-X

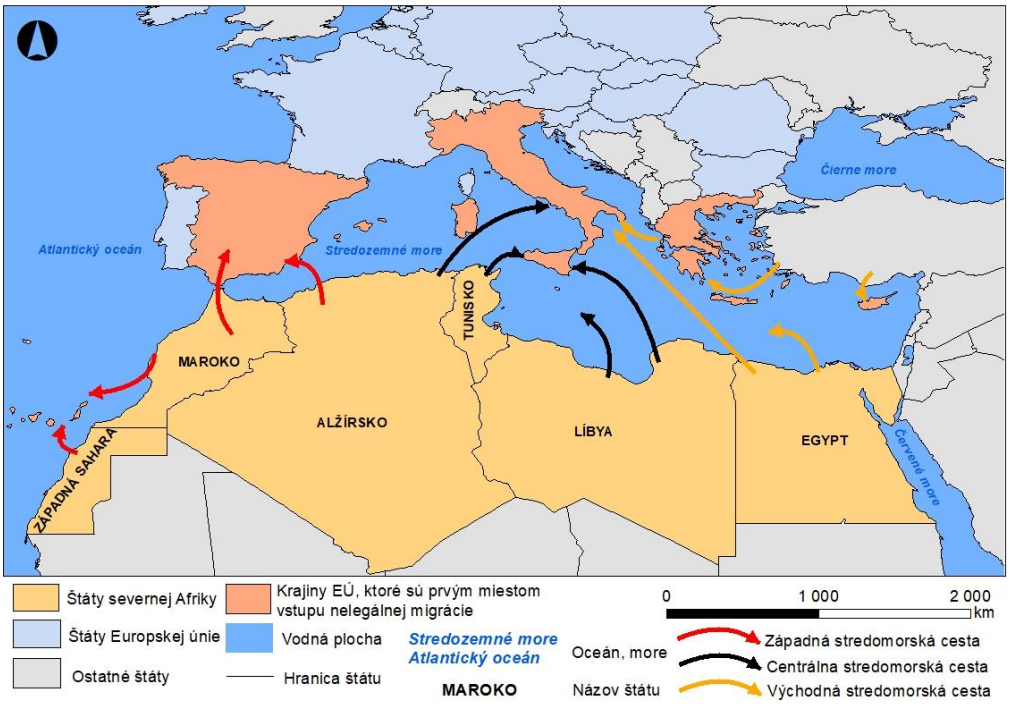
[3] Population total. [online]. THE WORD BANK: 2024. Dostupné z:

https://data.worldbank.org/indicator/SP.POP.TOTL?name_desc=false
[4] Surface area. [online]. THE WORD BANK: 2024. Dostupné z https://data.worldbank.org/indicator/AG.SRF.TOTL.K2?name_desc=false
[5] Západná Sahara. [online]. Population.city: 2015. Dostupné z: http://obyvatelstvo.population.city/zapadna-sahara/#1
[6] Word Map. [online]. Minority Rights Group: 2023. [cit. 06. 03. 2024]. Dostupné z: https://minorityrights.org/world-map/
[7] Západná Sahara. [online]. UPJS Košice. HUDAKOVÁ, Simona. 2018. [cit. 06. 03. 2024]. Dostupné z: https://web.science.upjs.sk/novotny/vybrane%20regiony/2018/SADR.pdf
[8] BOLEČKOVÁ, Martina. 2010. Migračná politika. Banská Bystrica : Univerzita Mateja Bela v Banskej Bystrici, Fakulta politických vied a medzinárodných vzťahov, 126 s. ISBN 978-80-557-0044-1
[9] JELEŇOVÁ, Iveta. 2017. Interkultúrne interakcie a migrácia, Vybrané aspekty problematiky. Košice : Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Fakulta verenej správy, Katedra sociálnych štúdií, 102. ISBN 978-80-8152-555-1
[10] ŽAC, Matúš. 2016. ANALÝZA MIGRAČNEJ KRÍZY V PRIESTORE EURÓPSKEJ ÚNIE. In Študentská vedecká a umelecká konferencia, roč. 13, s. 150 - 155. Dostupné z: https://www.pulib.sk/web/kniznica/elpub/dokument/Olostiak14/subor/Zac.pdf
[11] POUŠ, Richard, MADLEŇÁK, Tibor, GAJDOŠ, Alfonz, GURŇÁK, Daniel. 2021. SEVERNÁ AFRIKA. In: GURŇÁK, D. a kol. 2021. Geografia Afriky. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, s. 91 – 199. ISBN 978-80-223-5126-3
[12] Aké sú najčastejšie dôvody migrácie. [online]. Európsky parlament – Témy: 2023. [cit. 01. 03. 2024]. Dostupné z: https://www.europarl.europa.eu/topics/sk/article/20200624STO81906/ake-su-najcastejsie-dovody-migracie
[13] SOKOLOVÁ, V. 2022. Kvôli klíme sa presídli až 143 miliónov ľudí. In: Green Magazine, roč. 6, 2022, s. 54 – 55
[14] Consequences of Migration. [online]. Unacademy: 2024. [cit. 02. 03. 2024]. Dostupné z: https://unacademy.com/content/upsc/study-material/physical-geography/consequences-of-migration/
[15] Migračná a azylová politika EÚ. [online]. Rada Európskej únie: 2024. [cit. 29. 02. 2024]. Dostupné z: https://www.consilium.europa.eu/sk/policies/eu-migration-policy/
[16] Migrants Presence. [online]. The Displacement Tracking Matrix: 2023. Dostupné z: https://dtm.iom.int/europe/migrants-presence
[17] Azyl a migrácia v EÚ. [online]. Európsky parlament: 2023. Dostupné z: https://www.europarl.europa.eu/infographic/asylum-migration/index_sk.html#filter=2022
[18] Positive first instance decisions. [online]. Eurostat: 2024. Dostupné z: https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/migr_asydec1p/default/table?lang=en&category=migr.migr_asy.migr_asyltpind.migr_asyind
[19] Asylum benefits in the EU: A comparison. [online]. Deutsche Welle: 2018. [cit. 01. 03. 2024]. Dostupné z: https://www.dw.com/en/asylum-benefits-in-the-eu-how-member-states-compare/a-44298599
[20] Infografika – Migračné toky: Východná, Stredná a Západná cesta. [online]. Rada Európskej únie: 2024. Dostupné z: https://www.consilium.europa.eu/sk/infographics/migration-flows-to-europe/
[21] Arrivals. [online]. The Displacement Tracking Matrix: 2023. Dostupné z: https://dtm.iom.int/europe/arrivals
[22] MIGRATION WITHIN AFRICA. [online]. Missing migrants project: 2024. Dostupné z: https://missingmigrants.iom.int/region/africa?region_incident=4081&route=All&incident_date%5Bmin%5D=01%2F01%2F2014&incident_date%5Bmax%5D=12%2F31%2F2023
[23] Migration outlook: Emerging push factors West Africa to Europe. [online]. S&P Global Market Inteligence: 2022. Dostupné z: https://www.spglobal.com/marketintelligence/en/mi/research-analysis/migration-outlook-emerging-push-factors-west-africa-to-europe.html

Prílohy



Mapa 1 Vymedzenie územia, spracované v: ArcMap 10.1



Mapa 2 Migračné trasy zo severnej Afriky do Európskej únie
Zdroj: upravené podľa obrázku z internetu [23], autor: Brath, B. Migračné prúdy zo severnej Afriky do Európskej únie. 1:22 277 665. 2024. spracované v: ArcMap 10.1.

Znečistenie ovzdušia látkami PM_{10} počas Silvestra v roku 2023 na území Slovenska

Air pollution by PM_{10} substances during New Year's Eve in 2023 in the territory of Slovakia

Jakub Cimbala[1]
Školiteľ: Lenka Balážovičová[1]
[1]Katedra geografie a geológie, FPV UMB, Tajovského, 40, 974 01 Banská Bystrica
jakub.cimbala@student.umb.sk, lenka.anstead@umb.sk

Abstrakt

V tejto práci sa zaoberáme vplyvom ohňostrojov na znečistenie ovzdušia prachovými časticami (PM). Predmetným obdobím výskumu je 29. december 2023 až 1. január 2024. Štatisticky, použitím Mann-Kendalovho trendového testu a skúmali sme trend pozitívny alebo negatívny a graficky sme zhodnotili a porovnali znečistenie ovzdušia ZL PM_{10} na celom území Slovenska. Pomocou geoštatistickej analýzy IDW sme vytvorili interpolačné mapy znečistenia ovzdušia na Slovensku zobrazujúci namerané hodnoty ZL PM_{10}.

Cieľom tohto príspevku je štatisticky zhodnotiť a preukázať krátkodobé zhoršenie kvality ovzdušia znečisťujúcimi látkami PM_{10} počas, pred a po oslavách Nového roka na celom území Slovenka, predovšetkým v krajských mestách. Druhým cieľom je interpolovať namerané koncentrácie PM_{10} a graficky porovnať 31. december a 1. január o 02.00 hodine. Zistili sme, že najnižšie koncentrácie PM_{10} boli zaznamenané na stanici Stará Lesná (15) a najvyššie na stanici Brezno (234). Ďalej z krajských miest boli zaznamenané najvyššie koncentrácie PM_{10} v Žiline (193) a v Banskej Bystrici-Zelená (137) a najnižšie v Trenčíne (31) a v Prešove (49). V porovnaní 31. decembra 2023 a 1. januára bol najvyšší nárast koncentrácií PM_{10} na týchto staniciach: Liptovský Mikuláš (1100%), Martin (627%), Poprad (510%), Banská Bystrica-Zelená (496%), Žilina (408%), Oščadnica (404%), Trnava (364%), Košice-Štefánikova (327%), Ružomberok (313%), Brezno (255%), Senec (193%), Senica (183%), Krompachy (153%) a Púchov (149%).

Kľúčové slová: prachové častice, ohňostroje, Nový rok, krajské mestá, NMSKO

Abstract

In this paper, we deal with the impact of fireworks on air pollution with dust particles (*particulate matter*) (PM). The relevant period of the research is December 29, 2023, to January 1, 2024. Statistically, using the Mann-Kendal trend test, we examined the positive or negative trend and graphically evaluated and compared the pollutants PM_{10} air pollution in the entire territory of Slovakia. Using IDW geostatistical analysis, we created interpolation maps of air pollution in Slovakia showing the measured values of pollutants PM_{10}.

The aim of this paper is to statistically evaluate and demonstrate the short-term deterioration of air quality by PM_{10} pollutants during, before and after the New Year celebrations in the entire Slovak territory, especially in the regional cities. The second aim is to interpolate the measured PM_{10} concentrations and graphically compare December 31 and January 1 at 02:00. We found that the lowest PM_{10} concentrations were recorded at Stará Lesná station (15) and the highest at Brezno station (234). Furthermore, of the regional cities, the highest concentrations of PM_{10} were recorded in Žilina (193) and Banská Bystrica-Zelená (137), and the lowest in Trenčín (31) and Prešov (49). Comparing 31 December 2023 and 1 January, the highest increase in PM_{10} concentrations was at the following stations: Liptovský Mikuláš (1100%), Martin (627%), Poprad (510%), Banská Bystrica-Zelená (496%), Žilina (408 %), Oščadnica (404%), Trnava (364%), Košice-Štefánikova (327%), Ružomberok (313%), Brezno (255%), Senec (193%), Senica (183%), Krompachy (153 %) and Púchov (149%).

Key Words: particulate matter, fireworks, New Year's Eve, regional cities, NAQMN

„There's so much pollution in the air now that if it weren't for our lungs there'd be no place to put it all. "
Robert Orben

Úvod

V súčasnosti je znečistenie ovzdušia veľký problém a preto je kvalita ovzdušia jednou z dôležitých environmentálnych tém. Nebezpečné látky unikajú do životného prostredia prírodnými alebo antropogénnymi príčinami a môžu mať negatívne účinky na ľudské zdravie a životné prostredie. Vo vzduchu sa nachádzajú aj znečisťujúce látky (ZL), ktoré sú v podobe mikroskopických častíc, drobných kvapôčok a plynných látok. Medzi najzávažnejšie znečisťujúce látky v ovzduší, ktoré ovplyvňujú zdravie človeka patria atmosférické aerosóly (častice PM_{10} - *hrubé* a $PM_{2.5}$ - *jemné*), polycyklické aromatické uhľovodíky (PAH) a oxid dusičitý (NO_2) [1]. *Atmosférické aerosóly* predstavujú zmes vzduchu a čiastočiek, ktoré sú v ňom rozptýlené – to označujeme skratkou *PM (particulate matter)*. Súčasťou atmosférických aerosólov je napr. prach, morská soľ, kondenzované kvapôčky niektorých chemických látok, peľ a časti rastlín, výfukové emisie dieselových motorov, hmla či cigaretový dym. Častice PM sú obsiahnuté aj v zábavnej pyrotechnike, ktorá je pri oslavách Nového roka či počas festivalových slávností bežnou súčasťou programu. Častice PM sú dôsledkom výbuchu v nižšej vrstve atmosféry rozptýlené a kumuláciou značne narastá znečistenie ovzdušia jemnými a hrubými časticami [2] a môže spôsobiť nebezpečné úrovne znečistenia ovzdušia [3]. Atmosférické aerosóly (častice PM) sú spojené so zvýšenou úmrtnosťou a je odhadovaných 8,9 milióna predčasných ročných úmrtí na celom svete [4]. Vo všeobecnosti je znečistenie ovzdušia rôznymi ZL hlavnou príčinou chorôb respiračného a kardiovaskulárneho systému [5, 6]. Medzi možné riziká nevhodnej manipulácie so zábavnou pyrotechnikou sú početné zranenia. Najväčší počet zranení spojených so zábavnou pyrotechnikou bol zaznamenaný počas festivalov v Číne [7]. Legislatívne boli vymedzené limitné hodnoty na ochranu ľudského zdravia platné v EÚ a odporúčané Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO), ktoré sú prísnejšie a nesmú byť prekročené (Tab. 1). Zároveň pre hodnotenie kvality ovzdušia hodinových koncentrácií boli vymedzené maximálne hodinové koncentrácie. Aktuálny stav ovzdušia v konkrétnom mieste a čase merania kvality ovzdušia je hodnotený *indexom kvality ovzdušia (IKO)*. Na hodnotenie kvality ovzdušia pre hodinové koncentrácie ZL bolo vymedzených 5 stupňov kvality ovzdušia, v závislosti od nameraných koncentrácií, ktoré znázorňujú stav znečistenia ovzdušia od *veľmi dobrej* po *veľmi zlú* a sú znázornené aj farebne (Tab. 2).

Cieľom tohto príspevku je štatisticky zhodnotiť a preukázať krátkodobé zhoršenie kvality ovzdušia znečisťujúcimi látkami PM_{10} počas osláv Nového roka na celom území Slovenka, predovšetkým v krajských mestách. Druhým cieľom je interpolovať namerané koncentrácie PM_{10} a graficky porovnať 31. december a 1. január o 02.00 hodine.

ZL	Obdobie	Smernica	
		EU	WHO
$PM_{2.5}$	kalendárny rok	20 µg/m³	5 µg/m³
PM_{10}	kalendárny rok	40 µg/m³	15 µg/m³
PM_{10}	deň	50[1] µg/m³	-

[1] povolený počet prekročení: 35 krát za kalendárny rok

Tab. 1 Limitné hodnoty vybraných znečisťujúcich látok

Kvalita ovzdušia	PM_{10} (1h)
veľmi dobrá	0 - 20
dobrá	> 20 - 40
zhoršená	> 40 - 100
zlá	> 100 - 180
veľmi zlá	> 180

Tab. 2 Hodnotenie kvality ovzdušia hodinových koncentrácií ZL PM_{10}

Teoreticko-metodické východiská

Pre získanie informácií o koncentráciách ZL PM_{10} sme spolupracovali so Slovenským hydrometeorologickým ústavom (SHMÚ). V úvode sme pre vstup do problematiky znečistenia ovzdušia opísali stav kvality ovzdušia na Slovensku a negatívny vplyv ZL na zdravie človeka. Pri tvorbe kapitoly a podkapitoly sme vychádzali z práce Mladého a kol. [1], Holmesa a kol. [8], Morena a kol. [9], Barmana a kol. [10], Saeha a kol. [15], Bowetta a kol. [16], Liao a kol. [17], Hoek a kol. [18], Kuźma a kol. [19], Andersona a kol. [20], China a kol. [21], Lua a kol. [22] a Horneho a kol. [23].

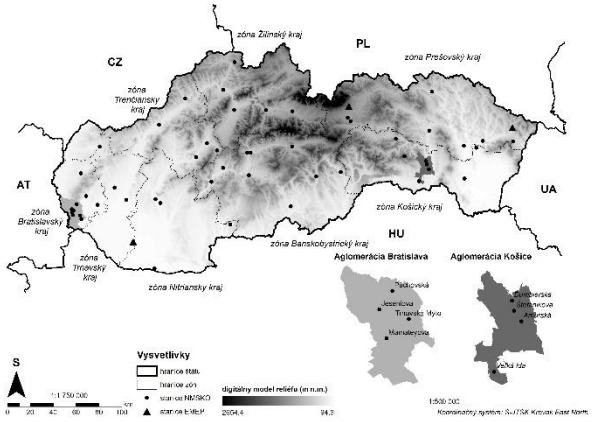
V kapitole *Vizualizácia dát ZL* sme sa zaoberali vizualizáciou vybraných ukazovateľov kvality ovzdušia ZL PM_{10} z vybraných 55 staníc SHMÚ. V softvéri ArcMap 10.8 (ArcGIS – ESRI) sme vytvorili hypsometrickú digitálnu mapu zobrazujúcu všetkých 55 aktívnych staníc NMSKO na území Slovenska. Vizualizáciu dát sme realizovali pomocou interpolačnej metódy IDW [24, 25]

a vytvorili sme dve digitálne interpolačné mapy zobrazujúce stav znečistenia ovzdušia ZL PM_{10}.

Dodatočným štatistickým testom Mann-Kendall (*MK*) trendového testu sme vypočítali a vyjadrili hodnotu *p* s pravdepodobnosťou alpha = 0.05 a skúmali sme trend negatívny alebo pozitívny. *MK* test sa široko používa pri zisťovaní trendov časových radov [33].

Študovaná oblasť

Predmetným územím tejto štúdie je celé územie Slovenskej republiky, predovšetkým krajské mestá: Bratislava, Trnava, Trenčín, Nitra, Žilina, Banská Bystrica, Prešov a Košice. Monitoring znečistenia ovzdušia je na Slovensku uskutočňované pomocou meracích staníc v rámci Národnej monitorovacej siete kvality ovzdušia (NMSKO) (Obr. 1).



Obr. 1 Monitorovacia sieť kvality ovzdušia NMSKO na území Slovenska

1.1 Znečisťujúce látky – prachové častice

Atmosférické aerosóly predstavujú zmes vzduchu a čiastočiek s aerodynamickým priemerom menším ako 10 µm, ktoré sú v ňom rozptýlené – to označujeme *PM (particulate matter)*. Súčasťou atmosférických aerosólov je napr. prach, morská soľ, kondenzované kvapôčky niektorých chemických látok, peľ a časti rastlín, výfukové emisie dieselových motorov, hmla či cigaretový dym [1]. Dym zo zábavnej pyrotechniky obsahuje prevažne dva typy atmosférických aerosólov: hrubých častíc (PM_{10}) a jemných častíc ($PM_{2.5}$) a je rozptýlený vo vzduchu počas aj po ohňostroji [8] a môže mať negatívny vplyv na miestnu kvalitu ovzdušia [9, 10].

1.2 Znečisťujúce látky – a ich vplyv na zdravie

Nebezpečné látky unikajú do životného prostredia v dôsledku prírodných a antropogénnych príčin, obe vznikajú lokálne [11]. Látky znečisťujúce ovzdušie nepriaznivo vplývajú na životné prostredie a ľudské zdravie, najviac na respiračný a kardiovaskulárny systém. Najštudovanejšie sú ZL PM_{10} a NO_2. Obe tieto ZL sú namerané v mestách z dopravy (cca 80% emisií pochádza z motorových vozidiel a priemyslu), zo spaľovania fosílnych palív, dreva, ropy, petroleja a uhlia [12, 13, 14]. Vysoké koncentrácie ZL pri dlhodobej expozícii môžu spôsobiť kardiovaskulárne poruchy (hypertenziu) [15] a zhoršenú funkciu pľúc [16], ktoré môžu spôsobiť rakovinu pľúc [17] čo spôsobuje vysokú respiračnú mortalitu [18]. Negatívny vplyv znečistenia ovzdušia ZL PM_{10} študovali aj Kuźma a kol. [19], Anderson a kol. [20], Chin [21], Lu a kol. [22] a Horne a kol. [23].

1.3 Vizualizácia dát ZL

Geoštatistická metóda IDW je jednou z mnohých metód, ktorá sa používa pri vizualizácií dát znečistenia ovzdušia [25]. IDW (*vážená vzdialenosť*) je založená na myšlienke, že hodnoty atribútov v blízkosti neznámej hodnoty atribútu sú podobné, ale podobnosť s narastajúcou vzdialenosťou slabne, preto má najbližší bod najväčšiu váhu [27]. Vizualizáciu dát sme realizovali pomocou interpolačnej metódy IDW [24, 25] a vytvorili sme dve digitálne interpolačné mapy zobrazujúce stav znečistenia ovzdušia ZL PM_{10}. Tieto mapy boli vytvorené pomocou nástroja *Spatial Analyst -> Interpolation -> IDW* [26].

Výsledky a diskusia

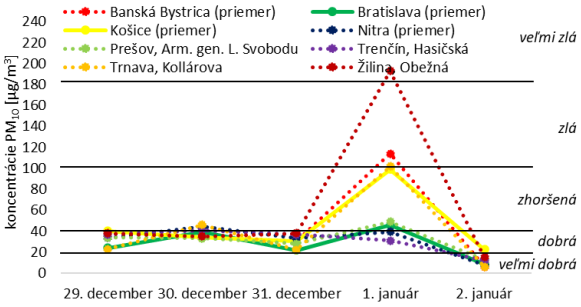
Naše výsledky sa opierajú o štatistické a grafické (mapové) vyhodnotenie stavu znečistenia ovzdušia pred, počas a po Silvestri. Pri analýze zmien znečistenia ovzdušia sme sa zamerali na vyhodnotenie a porovnanie priemerných hodinových koncentrácií prachových častíc (PM_{10}) na území Slovenska, predovšetkým v krajských mestách. Na hodnotenie hodinových koncentrácií PM_{10} bolo vymedzené obdobie od 31. decembra 2023 o 18.00 hodine do 1. januára 2024 o 02.00 hodine. Na hodnotenie priemerných denných koncentrácií PM_{10} bolo vymedzené obdobie od 29. decembra 2023 do 1. januára 2024. Analyzovali a porovnávali sme namerané koncentrácie PM_{10} na území Slovenska o 02.00 hodine v piatich dňoch od 29. decembra 2023 do 2. januára 2024.

Z hodnotenia krajských miest boli 1. januára o 02.00 hodine zaznamenané najvyššie koncentrácie PM_{10} na stanici v Žiline (193 µg/m^3) a ďalej na staniciach Banská Bystrica-Zelená (137 µg/m^3), Košice-Štefánikova (111 µg/m^3), Trnava (102 µg/m^3), Bratislava-Kamenné námestie (84 µg/m^3), Nitra-Štúrova (53 µg/m^3), Prešov (49 µg/m^3) a Trenčín (31 µg/m^3) (Graf 1).

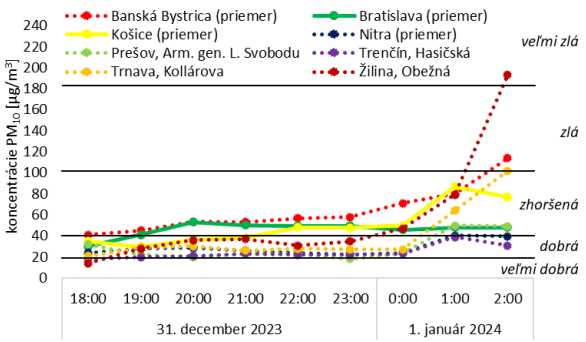
Z hodnotenia krajských miest v čase od 31. decembra 2023 od 18.00 hodiny do 1. januára 2024 do 02.00 hodiny sme zaznamenali lineárny nárast koncentrácií PM_{10} (Graf 2).

Z hodnotenia okresných a ostatných miest boli 1. januára o 02.00 hodine zaznamenané najvyššie koncentrácie PM_{10} na stanici v Brezne (234 µg/m^3), Oščadnici (131 µg/m^3), Púchove (122 µg/m^3), Liptovskom Mikuláši (120 µg/m^3), Jelšave (102 µg/m^3), Lučenci (98 µg/m^3), Krompachoch (86 µg/m^3), Senci (85 µg/m^3), Martine (80 µg/m^3). Najnižšie koncentrácie PM_{10} boli zaznamenané na stanici Stará Lesná (15 µg/m^3), Kolonické sedlo (16 µg/m^3), Topoľníky (19 µg/m^3), Žiar nad Hronom (25 µg/m^3).

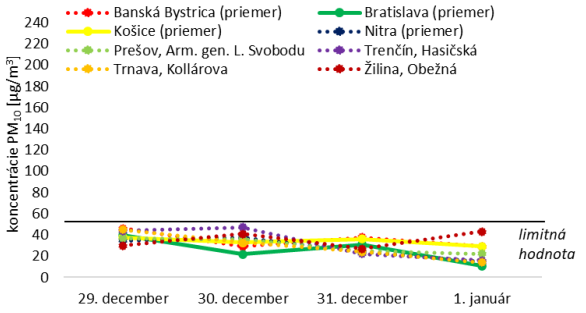
Porovnávali sme koncentrácie PM_{10} medzi dňami 31. decembra 2023 a 1. januára o 02.00 hodine zo všetkých staníc na území Slovenska a zistili sme, že najvyšší nárast bol na staniciach Liptovský Mikuláš (1100%), ďalej na staniciach Martin (627%), Poprad (510%), Banská Bystrica-Zelená (496%), Žilina (408%), Oščadnica (404%) (Príloha 1 a 2).



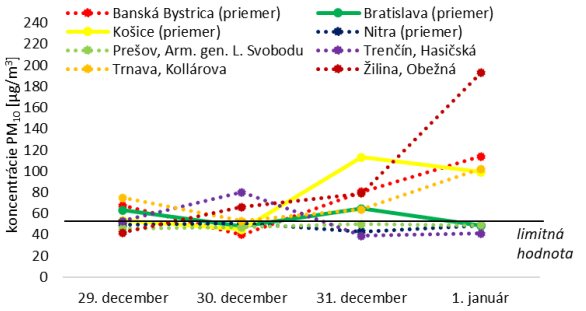
Graf 1 Koncentrácie PM_{10} o 02.00 hodine v krajských mestách



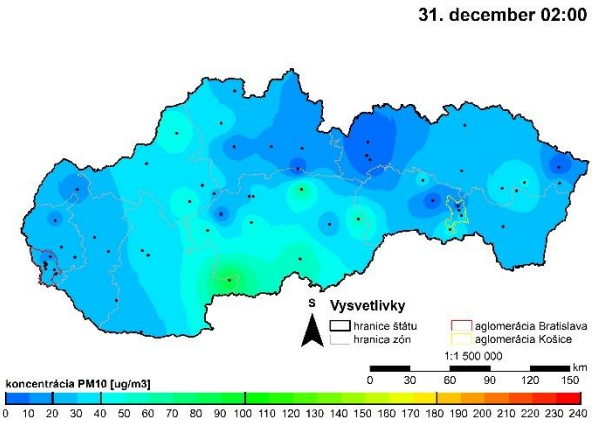
Graf 2 Koncentrácie PM_{10} od 31. decembra 18.00 do 1. januára 02.00 hodiny v krajských mestách



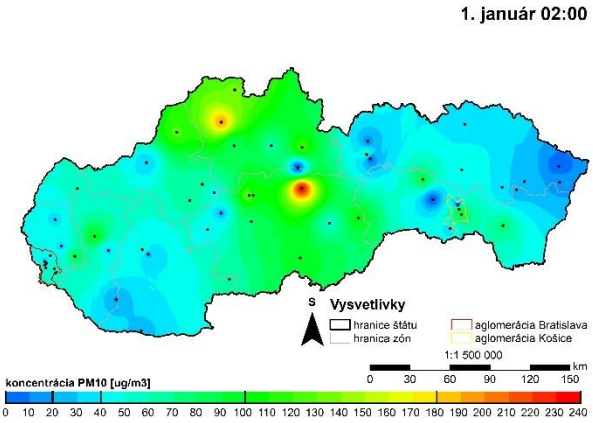
Graf 3 Denný chod koncentrácií PM_{10} od 29. decembra do 1. januára v krajských mestách



Graf 4 Maximálne namerané koncentrácie PM_{10} od 29. decembra do 1. januára v krajských mestách



Obr. 2 Mapa priemernej hodinovej koncentrácie PM_{10} na území Slovenska 31. decembra o 02.00 hodine



Obr. 3 Mapa priemernej hodinovej koncentrácie PM_{10} na území Slovenska 1. januára o 02.00 hodine

Výsledky ukazujú, že v predmetnom období (od 29. decembra 2023, od 18:00 do 1. januára 2024, do 02:00) pre *p*-hodnoty z Mann-Kendallovho testu sú zobrazené v tab. 4, kde premenná PM_{10} vykazuje významný trend. Väčšina trendov bola pozitívna: Žilina, Košice, Banská Bystrica, Trnava, Prešov a negatívna: Nitra, Bratislava, Trenčín.

Ďalej výsledky ukazujú, že v predmetnom období (od 29. decembra do 1. januára 2024 o 02:00) pre *p*-hodnoty z Mann-Kendallovho testu sú zobrazené v tab. 5 s pravdepodobnosťou alpha = 0.05, kde premenná PM_{10} vykazuje významný trend. Väčšina trendov bola pozitívna v staniciach Žilina a negatívna v staniciach Trenčín, Trnava, Bratislava, Nitra, Prešov, Banská Bystrica a Košice. Takže ak $p < 0.05$, nulová hypotéza je zamietnutá alebo inými slovami, máme dôkazy o monotónnom trende, ktorý nie je klesajúci ani rastúci a teda negatívny alebo pozitívny [34].

stanica	*p*-hodnota
Žilina	20.45
Košice	46.6
Banská Bystrica	18
Trnava	9.2
Prešov	1.2
Nitra	-0.95
Bratislava	-2.66
Trenčín	-7.7

Tab. 4 Trend hodinových koncentrácií PM_{10} v krajských mestách v období 29. decembra až 1. januára o 02.00 hodine

stanica	*p*-hodnota
Žilina	2.5
Košice	-2.25
Banská Bystrica	-4.25
Trnava	-10.2
Prešov	-5.6
Nitra	-7.35
Bratislava	-7.73
Trenčín	-10.9

Tab. 5 Trend denných koncentrácií PM_{10} v krajských mestách v období 29. decembra až 1. januára

Najvyššie koncentrácie ZL PM_{10} boli namerané 1. januára o 02.00 hodine na stanici NMSKO v Brezne (234 $\mu g/m^3$). V Holandsku boli zaznamenané v čase od 27. do 30. decembra priemerné denné koncentrácie cca 29 $\mu g/m^3$ a 1. januára sa o 01.00 hodine ráno zvýšili o 277 $\mu g/m^3$, v hustejšie obývaných oblastiach bol nárast ešte väčší cca 598 $\mu g/m^3$ [28].

Vo všeobecnosti je nárast znečistenia ovzdušia napríklad v Česku (Brno) boli v noci priemerné hodinové koncentrácie ZL PM_{10} na úrovni až 171 $\mu g/m^3$ [29] a v Kolumbii (Meddelín) boli 1. januára o 01.00 hodine priemerné koncentrácie ZL PM_{10} na úrovni až 120 $\mu g/m^3$ [30]. Najextrémnejšie namerané hodinové maximá PM_{10} nad 1000 $\mu g/m^3$ boli namerané v Číne, počas Čínskeho Nového roka a v Indii, počas indických festivalov Diwali [10]. Vo viacerých štúdiách boli po ohňostroji hlásené zvýšené koncentrácie $PM_{2.5}$ a PM_{10} [2, 31, 32].

Záver

Zisťovali sme znečistenie ovzdušia ohňostrojmi na Nový rok 2023/2024. Nárast početných koncentrácií na

území Slovenska až 2 hodiny po polnoci. Nárast ZL PM_{10} krátko po polnoci je presvedčivým dôkazom toho, že ohňostroje znečisťovali ovzdušie. V časovom rámci 2023 boli hodinové koncentrácie PM_{10} zo všetkých staníc najvyššie k 1. januáru 2024. V predmetnom období (od 29. decembra do 1. januára 2024) neprekračovali maximálnu dennú hodnotu PM_{10}, ako ju určuje vláda Slovenska (Slovenská republika) (50 $\mu g/m^3$). Odporúčané limity WHO (15 $\mu g/m^3$) boli prekročené na všetkých krajských staniciach. Použitím štatistických metód sme zistili významný pozitívny trend naznačujúci postupný nárast koncentrácií s blížiacim sa Novým rokom. Najvyššie koncentrácie PM_{10} boli zaznamenané 1. januára 2024 o 02:00. Údaje z monitorovania jasne ukazujú, že novoročný ohňostroj 2023/2024 prispel k výraznému znečisteniu ovzdušia na Slovensku.

Poďakovanie

Touto cestou by som chcel vyjadriť veľkú vďaku mojej školiteľke Mgr. Lenke Balážovičovej, PhD. za jej neoceniteľnú podporu a odborné rady pri písaní predkladaného príspevku a tiež SHMÚ za zverejnenie údajov použitých v tejto štúdii.

Použitá literatúra

[1] MLADÝ, Michal et al. 2021. Ovzdušie a zdravie na Slovensku v rokoch 2010-2020. In Meteorologický časopis, vol. 24, no. 2, pp. 105-116. ISSN 1335-339X.

[2] RETAMA, Armando et al. 2019. Fireworks: A major source of inorganic and organic aerosols during Christmas and New Year in Mexico city. In Atmospheric Environment: X, vol. 2, no. 100013, pp. 1-17. ISSN 2590-1621.

[3] CHEN, Shiyi et al. 2022. Fireworks regulation, air pollution, and public health: Evidence from China. In Regional Science and Urban Economics, vol. 92, no. 103722, pp. 1-21. ISSN 1879-2308.

[4] ANDRADOTTIR, Hrund – THORSTEINSSON, Throstur. 2019. Repeated extreme particulate matter episodes due to fireworks in Iceland and staheloders´ response. In Journal of Cleaner Production, vol. 236, no. 117511, pp. 1-11. ISSN 1879-1786.

[5] KHAFAIE, Morteza-Abdullatif et al. 2016. Critical review of air pollution health effects with special concern on respiratory health. In Journal of Air Pollution and Health, vol. 1, no. 2, pp. 123-136. ISSN 2476-3071.

[6] YANG, Di et al. Ambient Air Pollution and Biomarkers of Health Effect. In DONG, Guang-Hui. Ambient Air Pollution and Health Impact in China. Guangzhou, 2017, pp. 59-102. ISBN 978-981-10-5656-7.

[7] WANG, Cheng et al. 2014. Firework injuries at a major trauma and burn center: A five-year prospective study. In Burns, vol. 40, no. 2, pp. 305-310. ISSN 1879-1409.

[8] HOLMES, Nicholas et al. 2006. A review of dispersion modellin and its application to the dispersion of particles: An overview of different dispersion models available. In Atmospheric Environment, vol 40, no. 30, pp. 5902-5928. ISSN 1878-2442.

[9] MORENO, Teresa et al. 2007. Recreational atmospheric pollution episodes: Inhalable metalliferous particles from firework displays. In Atmospheric Environment, vol. 41, no. 5, pp. 913-922. ISSN 1878-2442.

[10] BARMAN, Shyamal et al. 2008. Ambient air quality of Lucknow City (India) during use of fireworks on Diwali Festival. In Environmental Monitoring and Assessment, vol 137, pp. 495-504. ISSN 1573-2959.

[11] TORNEVI, Andreas et al. 2022. Short-term associations between PM_{10} and respiratory health effects on Visby, Sweden. In Toxics, vol. 10, no. 6. ISSN 2305-6304.

[12] MORENO, Olaia-Bronte et al. 2023. Impact of Air Pollution on Asthma: A scoping Review. In Open Respiratory Archives, vol. 5, no. 2. ISSN 2659-6636.

[13] KALBARCZYK, Eliza – KALBARCZYK, Robert. 2016. Variability and time course of nitrogen oxides concentration in Poznan (Middle-Western Poland) and their dependence on wind direction. In Geographical Information, vol. 20, no. 6, pp. 201-215. ISSN 1337-9453.

[14] JARVIS, Debbie et al. Nitrogen dioxide. In WHO guidelines for indoor air quality: Selected pollutants. Geneva, 2010, pp. 201-248. ISBN 978-92-890-0213-4.

[15] SAEHA, Shin et al. 2020. Association betwwen road traffic noise and incidence of diabete mellitu and hypertension in Toronto, Canada. In Journal of the American Heart Association, vol. 17, no. 6. ISSN 2047-9980.

[16] BOWETTE, Gayan et al. 2017. Traffic-related air pollution exposure over a 5-year period is associated with increased risk of asthma and poor lung function in middle age. In European Respiratory Journal, vol. 50, no. 4, pp. 1-11. ISSN 1399-3003.

[17] LIAO, Suiling et al. 2022. The respiratory impacts of air polluton in children: Global and domestic (Taiwan) situation. In Biomedial Journal, vol. 45, no. 1, pp. 88-94. ISSN 2320-2890.
[18] HOEK, Gerard et al. 2013. Long-term air pollution exposure and cardio-respiratory mortality: a review. In Environmental Health, vol. 12, no. 43, pp. 2-15. ISSN 1476-069X.
[19] KUŹMA, Łukasz et al. 2020. The 10-Year study of the impact of particulate matters on mortality in two transit cities in North-Eastern Poland (PL-PARTICLES). In Journal of Clinical Medicine, vol. 9, no. 11. ISSN 2077-0383.
[20] ANDERSON, Jonathan et al. 2012. Clearing the air: A review of the effects of particulate matter air pollution on human health. In Journal of Medical Toxicology, vol. 8, no. 2, pp. 166-175. ISSN 1937-6995.
[21] CHIN, Michael. 2018. Basic mechanisms for adverse cardiovascular events associated with air pollution. In Heart, vol. 101, no. 4, pp. 253-256. ISSN 1468-201X.
[22] LU, Feng et al. 2015. Systematic review and meta-analysis of the adverse health effects of ambient $PM_{2.5}$ and PM_{10} pollution in Chinese population. In Environmental Research, vol. 136, pp. 196-204. ISSN 1096-0953.
[23] HORNE, Benjamin et al. 2018. Short-term elevation of fine particulate matter air pollution and acute lower respiratory infection. In American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 198, no. 6. ISSN 1535-4970.
[24] BERROCAL, Veronica et al. 2020. A comparison of statistical and machine learning methods for creating national daily maps of ambient $PM_{2.5}$ concentration. In Atmospheric Environment, vol. 222, no. 117130. ISSN 1878-2442.
[25] JERRETT, Michael et al. 2013. Spatial analysis of air pollution and mortality in California. In American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 188, no. 5, pp. 593-599. ISSN 1535-4970.
[26] KLAUČO, Michal et al. 2014. Geografické informačné systémy 3. Banská Bystrica : Fakulta prírodných vied UMB, 87 s. ISBN 978-80-557-0691-7.
[27] BALÁŽOVIČ, Ľuboš. 2015. Spracovanie a analýzy geopriestorových údajov. Banská Bystrica : Fakulta prírodných vied UMB, 160 s. ISBN 978-80-557-0953-6.
[28] GREVEN, Frans et al. 2019. Air pollution during New Year's fireworks and daily mortality in the Netherlands. In Scientific Reports, vol. 9, no. 5735. ISSN 2045-2322.
[29] TANDA, Stefan et al. 2019. Impact of New Year's Eve fireworks on the size resolved element distributions in airborne particles. In Environment International, vol. 128, pp. 371-378. ISSN 1873-6750.
[30] HOYOS, Carlos et al. 2019. Effects of ireworks on particulate matter concentration in a narrow valley: the case of the Meddelín metropolitan area. In Environmental Monitoring and Assessment, vol. 192, no. 6. ISSN 1573-2959.
[31] WANG, Ying et al. 2007. The air pollution caused by the burning of fireworks during the lantern festival in Beijing. In Atmospheric Environment, vol. 41, no. 2, pp. 417-431. ISSN 1878-2442.
[32] AMBADE, Balram. 2018. The air pollution during Diwali festival by the burning of fireworks in Jamshedpur city, India. In Urban Climater, vol. 26, pp. 149-160. ISSN 2212-0955.
[33] WANG, Fan et al. 2020. Re-evaluation of the Power of the Mann-Kendall Test for Detecting Monotonic Trends in Hydrometorological Time Series. In Frontiers in Earth Science, vol. 8, no. 14. ISSN 2296-6463.
[34] PIRKER, Luka et al. 2022. Fireworks – a source of nanoparticles, $PM_{2.5}$, PM_{10}, and carbonaceous aerosols. In Air Quality, Atmosphere & Health, vol. 15, pp. 1275-1286. ISSN 1873-9326.

Príloha 1 Rozdiel koncentrácií ZL PM_{10} v krajských mestách na území Slovenska

stanica	Banská Bystrica, Št.náb.	Banská Bystrica, Zelená	Bratislava, Jeséniova	Bratislava, Kamenné námestie	Bratislava, Mamateyova	Bratislava, Padlých hrdinov, M-AMS	Bratislava, Púchovská	Bratislava, Trnavské Mýto	Košice, Amurská	Košice, Ďumbierska	Košice, Štefánikova	Nitra, Janíkovce	Nitra, Štúrova	Prešov, Arm. gen. L. Svobodu	Trenčín, Hasičská	Trnava, Kollárova	Žilina, Obežná
31. december	38	23	13	26	21	26	14	27	35	-	26	34	32	28	37	22	38
1. január	91	137	25	84	48	61	39	32	87	-	111	26	53	49	31	102	193
rozdiel [%]	139	**496**	92	**223**	129	135	**179**	19	149	-	**327**	-24	66	75	-16	**364**	**408**

Príloha 2 Rozdiel koncentrácií ZL PM_{10} v okresných mestách a ostatných častiach na území Slovenska

stanica	Bardejov	Brezno	Bystričany	Gánovce	Handlová	Hnúšťa	Humenné	Chopok, EMEP	Jelšava	Kojšovská hoľa	Kolonické sedlo	Komárno	Krompachy	Liptovský Mikuláš	Lučenec	Martin	Oščadnica	Pezinok	Plášťovce
31. december	25	66	50	-	29	24	42	-	54	-	23	26	34	10	60	11	26	27	86
1. január	30	***234***	70	-	46	56	22	-	102	-	16	26	86	120	98	80	131	34	64
rozdiel [%]	20	**255**	40	-	59	133	-48	-	89	-	-30	0	153	**1100**	63	**627**	**404**	26	-26

stanica	Poprad	Prievidza	Púchov	Rohožník	Rovinka, M-AMS	Ružomberok	Senec	Senica	Sereď	Stará Lesná, EMEP	Starina, EMEP	Strážske, Mierová	Topoľníky, EMEP	Trebišov	Veľká Ida	Vranov nad Topľou	Zvolen	Žarnovica	Žiar nad Hronom
31. december	10	37	49	19	29	16	29	18	29	0	-	36	21	25	44	34	45	51	8
1. január	61	61	122	36	52	66	85	51	37	15	-	23	19	74	33	36	79	41	25
rozdiel [%]	**510**	65	149	89	79	**313**	193	183	28		-	-36	-10	196	-25	6	76	-20	213

Zaujímavé úlohy z biológie človeka pre žiakov základných škôl

Interesting assignment from human biology for primary school learners

Janka Cvachová[1]
Školiteľ: Anna Sandanusová[1]
[1] Katedra zoológie a antropológie, FPVaI UKF, Nábrežie mládeže 91, 949 01 Nitra
janka.cvachova@student.ukf.sk, asandanusova@ukf.sk

Abstrakt

Práca predstavuje niekoľko zaujímavých úloh z biológie človeka pre žiakov 7. ročníka základných škôl. Predkladané nami vytvorené učebné úlohy obsahujú podrobný popis a charakteristiku každej úlohy.

Prostredníctvom odbornej literatúry, dávame k dispozícii ucelený pohľad na schopnosti žiakov, ktoré je potrebné na vyučovaní rozvíjať. Okrem toho sa v tomto príspevku nachádzajú aj zaujímavé úlohy z biológie človeka pre žiakov 7. ročníka, pri ktorých sme využívali Bloomovu taxonómiu a metódu E-U-R.

Súčasťou práce je aj nami vytvorený vzorový pracovný list na tému zmyslová sústava, ktorý je určený pre žiakov 7. ročníka, rešpektujúci Bloomovu taxonómiu. Vytvorený metodický materiál slúži na lepšie porozumenie zmyslovej sústavy u človeka a taktiež prináša aj zaujímavé úlohy, ktorými sa učiteľ môže inšpirovať.

Kľúčové slová: zaujímavé úlohy, biológia človeka, základná škola

Abstract

The work presents several interesting tasks from human biology for 7th grade elementary school learners. The learning tasks created by us contain a detailed description and characteristics of each task.

Through scientific literature, we provide a complex view on the learners' abilities that need to be developed during the education process. In addition, this post also contains interesting tasks from human biology for 7th grade students, where we used Bloom's taxonomy and the E-U-R method.

A sample worksheet created on our own on the topic of the sensory system, which is intended for 7th grade students, respecting Bloom's taxonomy, is also part of the work. The created methodical material serves for a better understanding of the human sensory system and also brings interesting tasks that the teacher can use for inspiration.

Keywords: interesting tasks, human biology, elementary school

Úvod

„Hlavným cieľom vzdelávania na školách by malo byť urobiť z mužov a žien ľudí schopných robiť nové veci, nielen opakovať to, čo dokázali predošlé generácie.“

Jean Piaget

V súčasnom vzdelávacom prostredí je nevyhnutné venovať väčšiu pozornosť spôsobom, ako zaujať a angažovať žiakov počas vyučovacích hodín. Často sa stretávame so situáciou, kedy sú žiaci pasívni a málo motivovaní. Aby sme zlepšili túto dynamiku, je dôležité integrovať do vyučovania biológie metódy a formy, ktoré budú zaujímavé a podporia aktívnu účasť študentov.

Moderné vyučovacie techniky nielenže znižujú pasivitu študentov, ale aj rozvíjajú ich kritické myslenie a schopnosti, ktoré by sa pri tradičnom výklade mohli zanedbať. S ohľadom na variabilitu vyučovacích hodín a obsahu učiva je možné vybrať rôzne náročné aktivity, ktoré posilňujú motiváciu študentov a uľahčujú im učenie nových tém.

Tento príspevok sa venuje problematike využívania zaujímavých úloh na hodinách biológie človeka. Metodika práce je opísaná v úvodnej časti, kde sa uvádzajú postupy, ktoré boli použité pri tvorbe príspevku.

V hlavnej časti predstavujeme vlastnú prácu, a to zaujímavé úlohy z biológie človeka, navrhnuté na základe moderných vyučovacích metód. Tieto úlohy sú dôkladne popísané s jasnými cieľmi a postupmi.

Práca obsahuje aj vzorový pracovný list s rôznymi typmi úloh, ktoré sú špecificky navrhnuté na podporu rôznych aspektov učenia.

1 Metodika práce

V prvom kroku tvorby tohto príspevku sme sa zamerali na získanie prvotných informácií od našej konzultantky. Pri vytváraní textu sme sa opierali najmä o literárnu metódu. Venovali sme sa dôkladnému zhromažďovaniu publikácií z odbornej, biologickej, metodickej a pedagogickej literatúry, ako aj zahraničných zdrojov. Naším cieľom bolo preskúmať odbornú literatúru, aby

sme získali čo najviac informácií o problematike a téme: Zmyslová sústava pre žiakov 7. ročníka základnej školy.

V priebehu písania sme preštudovali množstvo knižných publikácií od autorov uvedených v literatúre, ako aj rôzne internetové zdroje relevantné k danej téme. Okrem toho sme sa zamerali aj na analýzu základných pedagogických dokumentov, ako je Štátny vzdelávací program a ISCED2. Práca s literatúrou nám poskytla pevný základ pre ďalšie hlbšie pochopenie problematiky.

Pri tvorbe zaujímavých úloh sme postupovali podľa rôznych vyučovacích metód. Úlohy, ktoré sme zahrnuli do príspevku, boli buď našej vlastnej tvorby alebo sme ich adaptovaním prispôsobili k téme. Každá úloha bola navrhnutá tak, aby pomohla učiteľom lepšie vysvetliť zmyslovú sústavu ich žiakom. Niektoré z týchto úloh sú známe z pedagogických diel, ale my sme ich modifikovali podľa našich potrieb. Pri každej úlohe sme uviedli zdroj, z ktorého sme čerpali, s najväčšou frekvenciou sme sa opierali o práce autorov Čapeka (2015) a Sieglovej (2019).

Vzhľadom na to, že kľúčovou témou biológie v 7. ročníku je človek, všetky naše úlohy boli sústredené na zmyslovú sústavu človeka.

Na záver sme vytvorili pracovný list na tému: Zmyslová sústava pre žiakov 7. ročníka základnej školy. Pri tvorbe jednotlivých úloh sme využili revidovanú Bloomovu taxonómiu. Bohužiaľ, kvôli tomu, že žiaci v čase tvorby nášho príspevku ešte túto látku nepreberali, nebolo možné overiť účinnosť pracovného listu v praxi.

1.1 Clustering – zhlukovanie

Túto metódu nazývame aj ako písanie, ktoré je automatické. Písanie by nemalo byť nejakým spôsobom vedomím upravované a taktiež nie je podstatná ani gramatická stránka. Je to pravidlo, ktoré sa vzťahuje na všetky metódy, ktoré sú asociačno-evokačné.

Clustering je najvhodnejšie využívať v začiatočnej časti hodiny ako zoznámenie sa s daným učivom a hľadanie vzťahov medzi nimi. Ide o asociačnú metódu, kde žiaci píšu v určitom čase asociácie k danej téme. Na záver z asociácií žiaci vytvoria text. V texte by mala byť nadväznosť medzi jednotlivými pojmami a úsilie o zachytenie súvislosti [1].

Ďalšia možnosť, ako sa dá využiť clusteringu:

- na čistý papier do stredu sa napíše hlavné slovo, ktoré následne bude výraznejšie ohraničené;
- následne sa vypisujú všetky spoločné pojmy, ktoré nám napadnú. Vypísané pojmy sa nehodnotia. Táto časť je realizovaná približne 3 minúty;
- pojmy, ktoré by mohli mať niečo spoločné, spojíme čiarou a farebne označíme;
- snažíme sa písať čo najrýchlejšie a nerozmýšľať, či je v poriadku pravopis. Vytvorením takejto mapy sa nám následne bude ľahšie tvoriť text.

Táto metóda je veľmi pochvaľovaná u žiakov, hlavne u dyslektikov, lebo úlohou nie je písať celé vety, ale stačí sa zameriavať iba na slovné spojenia alebo jedno slovo [2].

1.2 Snehová guľa (snowballing)

Pri tejto metóde sa rozvíjajú hlavne kognitívne a sociálne skúsenosti [1]. Metóda snehová guľa prebieha v skupinách a pre učiteľa je stredne náročná na organizáciu a prípravu. Žiaci na začiatku pracujú individuálne a následne spolupracujú v dvojiciach. Po určitom čase sa tvoria väčšie skupiny, kde diskusiou presadzujú ďalšie svoje názory. Táto metóda nie je vekovo ohraničená. Môže sa využívať v ľubovoľnom ročníku a na ktorejkoľvek škole [3]. Vytváraním menších skupín počas tejto aktivity dosiahneme, aby boli aktívni aj žiaci, ktorí sú menej dominantní [4].

Ako opisuje Čapek [2015], žiaci musia nájsť riešenia k problematike a následne dochádza k porovnávaniu s ostatnými, ktorí prichádzajú do skupiny. Učiteľ môže riešiť so žiakmi aj samotný proces, ako mali rozdelené jednotlivé úlohy, ako spolu komunikovali, kto bol hlavný v skupine a riadil ich a i. [1].

Žiaci pracujú na zadaných úlohách, ktoré im postupne určuje učiteľ. Taktiež učiteľ volí v jednotlivých skupinách jedného hovorcu, zapisovateľa a pozorovateľa v danej skupine. Túto metódu je vhodné použiť počas opakovania učiva, ale aj v hlavnej časti hodiny [5].

1.3 Cinquain (päťlístok)

Zakladateľkou tejto metódy bola americká spisovateľka Adelaide Crapsey. Názov má francúzske korene a vyplýva zo slova päť. Táto metóda nás vedie k stručnosti, jasnosti a k podstate veci [6].

Päťlístok je najlepšie využívať hneď na začiatku hodiny v motivačnej časti alebo pri upevňovaní si nového učiva. Je vhodné ho zaradiť aj v reflexnej fáze, kde si žiaci zapisujú svoje poznatky do schémy, pričom prepájajú nové poznatky so staršími a upevňujú si ich [7].

Cinquain môžeme nazvať aj päťriadkovou básňou. Ide o báseň, ktorá je krátka a nerytmická [8]. Princípom

tejto metódy je, aby určitý pojem bol opísaný rôznymi slovami v piatich riadkoch. Metóda päťlístok nie je náročná a jej realizácia je veľmi rýchla, keď žiaci vedia ako majú pracovať [9].

Steele (1997) uvádza zhrnutie témy do piatich riadkov. V prvom riadku sa vyskytuje téma opísaná jedným slovom, zvyčajne to je podstatné meno, druhý riadok obsahuje dve slová, ktorými žiak opisuje tému, väčšinou sú to prídavné mená, tretí riadok by mal obsahovať vyjadrenie činnosti, je zložený z troch slovies, v predposlednom riadku žiak vyjadruje svoje pocity a vzťah k téme štyrmi slovami a v piatom riadku má žiak vymyslieť synonymum k danej téme [10].

Žiaci pri tejto aktivite pracujú samostatne, ale niekedy môžu pracovať aj v skupinách. Úlohou učiteľa je stanoviť zadanie témy, ktorej sa budú venovať. Učiteľ môže ďalej postupovať dvojakým spôsobom. Prvou možnosťou môže byť na tabuli nakreslený postup schémy tejto metódy a následná realizácia navádzajúcich otázok, ktoré slúžia k tomu, aby žiak vedel podľa tejto schémy pracovať na jednotlivých riadkoch. Ďalšou z možností je spoločná realizácia jednotlivých stupňov pri tvorbe básničky. Postupuje sa po jednotlivých riadkoch, kde učiteľ zadáva pokyny k danému riadku a až po následnom dosiahnutí prvého bodu sa presúva k ďalšiemu bodu [11].

1.4 Model vyučovacej hodiny

• Tematický celok / Téma	• ISCED / Odporúčaný ročník
• Človek a jeho telo • Zmyslová sústava	• ISCED 2 / 7.ročník
• Ciele	
• Žiakom osvojované vedomosti a zručnosti	• Žiakom rozvíjané spôsobilosti
• Vymenovať pojmy, ktoré súvisia s ochoreniami zmyslovej sústavy. • Priradiť pojmy do jednotlivých kategórii. • Zhrnúť získané poznatky a vedomosti. • Riešiť zadaný problém. • Obhájiť svoje tvrdenie. • Navrhnúť riešenie problému. • Porovnávať postrehy v skupinách. • Obhájiť svoj názor v skupine. • Aplikovať poznatky pri jednotlivých aktivitách. • Vytvoriť báseň.	• U žiakov rozvíjať spoluprácu v skupinách. • Schopnosť analyzovať informácie a myšlienky, vytvárať vysvetlenia argumentácií a záverov. • Schopnosť rozvíjať kritické myslenie a vedieť vyjadriť svoj názor.
• Požiadavky na vstupné vedomosti a zručnosti	
• Žiak má základné vedomosti o zmyslových orgánoch a ich ochoreniach. • Vedieť pracovať v skupinách a v kolektíve.	
• Riešený didaktický problém	
• Téma Zmysly a ich ochorenia. Je veľmi dôležité si chrániť naše zmyslové orgány pred nevhodnými vplyvmi, v dôsledku čoho zabezpečíme, aby orgány neboli poškodené. Medzi najčastejšie ochorenia, ktoré sa prejavujú u človeka, je napríklad krátkozrakosť alebo ďalekozrakosť, ktorá sa prejavuje skôr u starších ľudí. Veľa mladých ľudí sa ostýcha kvôli zrakovým ochoreniam, ale v dnešnej dobe je to už bežným problémom u viacerých ľudí. • Pri riešení úloh sa budeme stretávať s rôznymi druhmi ochorenia zmyslových orgánov, v ktorých môžu žiaci vyjadriť aj ich osobnú skúsenosť alebo aj poznatky, ktoré majú k danej téme. Zmysly si zaslúžia takú istú pozornosť ako aj zvyšok ľudského tela.	
• Dominantné vyučovacie metódy a formy	• Príprava učiteľa a pomôcky
• Metóda EUR • Snehová guľa • Clustering • Cinquain (päťlístok) • Diskusia	• Papier • Tabuľa • Zošit
• Diagnostika splnenia vzdelávacích cieľov	
• Diskusia • Vytvorenie básne	

Priebeh výučby:

EVOKÁCIA (približne 13 minút)

Prostredníctvom tejto metódy sme zistili, aké doterajšie získané poznatky už žiaci majú k téme *Ochorenia zmyslovej sústavy.*

CLUSTERING

Ako sme spomínali v predchádzajúcom opise jednotlivých metód, ide o metódu, ktorej cieľom je napísať čo najviac pojmov k danej téme a následne ich zaradiť do jednotlivých kategórií. Pomocou tejto metódy sa žiaci oboznámia s novým učivom, ale aj s jednotlivými vzťahmi, ktoré s nachádzajú medzi nimi [1].

Priebeh aktivity: Každý žiak na papier napísal čo najviac pojmov, ktoré ho napadli k téme *Ochorenie zmyslovej sústavy*. Následne jednotlivé pojmy žiaci na tabuli zaraďovali do jednotlivých kategórií.

Predpokladané odpovede:

Pojmy: krátkozrakosť, pigmentové škvrny, nádcha, strata chuti, škúlenie, zápal nosovej sliznice, hluchota, šedý zákal, slepota, ďalekozrakosť, nedoslýchavosť, slabozrakosť, zápal spojovky, zápal stredného ucha, strata čuchu, alergia, zápal ústnej dutiny, strata citlivosti, popálenina

ZRAK	SLUCH	CHUŤ	ČUCH	HMAT
krátkozrakosť	hluchota	zápal ústnej dutiny	nádcha	popálenina
škúlenie	nedoslýchavosť	strata chuti	strata čuchu	strata citlivosti
šedý zákal	zápal stredného ucha		alergia	pigmentové škvrny
slepota			zápal nosovej sliznice	
ďalekozrakosť				
slabozrakosť				
zápal spojovky				

Obr. 1 Predpokladané odpovede

UVEDOMENIE SI VÝZNAMU (približne 20 minút)

V tejto hlavnej časti sme využívať metódu snehová guľa. Prostredníctvom tejto metódy žiaci získali nové informácie a poznatky.

SNEHOVÁ GUĽA

Ako sme spomínali v predchádzajúcom opise jednotlivých metód, ide o metódu, ktorá vedie žiakov k rozvoju kognitívnych a sociálnych skúseností. Prostredníctvom tejto metódy žiaci musia nájsť riešenie k danej problematike [1].

Aktivita: Žiaci boli rozdelení do skupín a ich úlohou bolo sa postupne spájať a zjednocovať svoje návrhy k danej téme *Ochorenia zmyslov.*

Priebeh aktivity: Ako prvé sme žiakov rozdelil do trojíc. Následne sme im zadali tému *Bežné ochorenia zmyslov a ich možnosti liečby*. Žiaci v trojiciach pracovali nad témou a svoje poznatky, postrehy si zapisovali na papier. Potom sme trojice spojili s ďalšou skupinou, kde následne spoločne skúmali svoje postrehy k téme. Vytvorené skupiny si spoločne zas zapísali svoje postrehy. Takto sa to opakovalo, až kým nevznikla jedná veľká skupina.

Predpokladané odpovede:

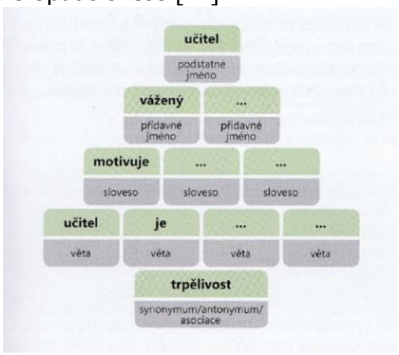
Medzi bežné ochorenia môžeme zaradiť krátkozrakosť, ďalekozrakosť, nedoslýchavosť, škúlenie a popáleniny. Jednotlivé ochorenia, napríklad zraku, sa dajú riešiť okuliarmi alebo šošovkami. Rôzne popáleniny môžeme vyriešiť rozličnými krémami, ktoré sú pre to určené. Ľudia, ktorí počujú slabšie alebo zle, im môže pomôcť načúvací prístroj. Škúlenie sa dá vyliečiť tak, že sa bude jedno okolo prekrývať oklúziou.

Na záver tejto aktivity cela trieda spoločne predstavila svoje postrehy a poznatky, prípadne, ak bolo treba, zaradili sme diskusiu.

REFLEXIA (približne 12 minút)

CINQUAIN (PÄŤLÍSTOK)

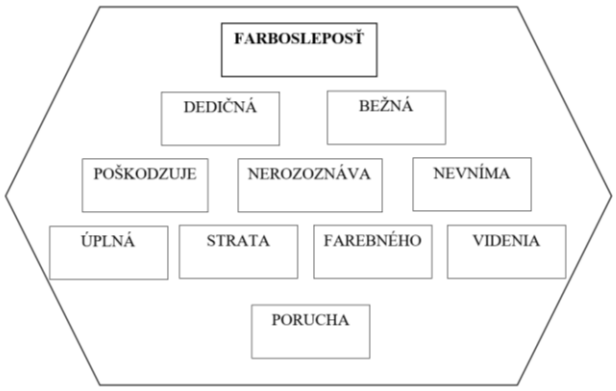
Ide o metódu, ktorá sa sústredí na rozvoj kreatívneho myslenia a schopností. Žiaci prostredníctvom tejto metódy vytvárali básničku, ktorej schéma bola rozložená do piatich riadkov. Do prvého riadku bolo učiteľom určené jedno podstatné meno, druhý riadok obsahoval dve prídavné mená, tretí riadok zahŕňal tri slovesa, štvrtý riadok pozostával z vety, ktorá sa skladala zo štyroch slov a na záver v piatom riadku sa nachádzalo opäť sloveso [12].



Obr. 2 Cinquain
Zdroj: [12]

Aktivita: Žiaci vytvárali básne, ktoré následne predstavili svojim spolužiakom. V prvom riadku bolo určené podstatné meno FARBOSLEPOSŤ.

Predpokladané odpovede:



Obr. 3 Predpokladané odpovede

2 Výsledky a diskusia

Vďaka našej práci sme vytvorili metodické materiály a tento pracovný list. Pracovný list obsahuje farebne zvýraznené charakteristiky a poznámky pre učiteľa k jednotlivým úlohám. Tieto poznámky pomôžu učiteľovi pri vedení žiakov a uľahčia prácu s danými úlohami.

Pracovný list pre 7. ročník – vypracovaný

1. Zdôvodnite, prečo necítime chuť, keď si popálime jazyk:

(Táto úloha je vytvorená pomocou aktivizujúceho slovesa zdôvodni, ktoré sa začleňuje do klasifikácie hodnotiaceho posúdenia a ktoré nájdeme v taxonómii podľa Blooma. V rámci tejto úlohy sa rieši problém. Úloha rozvíja vyššie poznávacie schopnosti žiakov.)

Riešenie: Popálený jazyk, napríklad horúcim čajom alebo polievkou spôsobil, že sme stratili vnímanie chuti. V takýchto prípadoch v skutočnosti nejde o odumretie chuťových buniek, ako si často mnohí myslia. Ide iba o dočasné sčervenanie a znecitlivenie chuťových pohárikov. Napriek tomu, že tento pocit môže byť nepríjemný, nie je dôvod na obavy, pretože sa chuťové bunky každých dvanásť dní obnovujú a nahrádzajú staré bunky. Je dôležité si uvedomiť, že chuťové poháriky zostávajú nemenné.

2. Vyvoď záver, prečo je správna starostlivosť o zrak dôležitá:

(Táto problémová úloha je vytvorená pomocou aktivizujúceho slovesa vyvoď záver, ktoré sa začleňuje do klasifikácie hodnotiaceho posúdenia a nájdeme ho v taxonómii podľa Blooma. Úloha rozvíja vyššie poznávacie schopnosti žiakov.)

Riešenie: Starostlivosť o zrak je dôležitá preto, aby náš zrak stále fungoval tak, ako má. K tomu nám napomáhajú zásady ako čítanie kníh pri správnom osvetlení, čítať a písať v určitej vzdialenosti približne 30 cm od očí, využívať slnečné okuliare, ktoré obsahujú UV filter, ktorý napomáha k ochrane zraku. Ďalej je potrebné zaradiť do svojho jedálnička väčšie množstvo zeleniny a ovocia. Prostredníctvom týchto zásad môžeme svoj zrak ochrániť lepšie.

3. Priraďte jednotlivé pojmy do príslušnej skupiny v tabuľke. Pozor, nie každý pojem sa vzťahuje na uvedenú kategóriu:

(V rámci tejto úlohy rozvíjame u žiakov kritické myslenie, pretože pri vypracovávaní musia žiaci rozmýšľať, ktoré pojmy zaradiť do danej skupiny. Na zameranie úlohy bolo z hľadiska Bloomovej taxonómie využité aktivizujúce sloveso priraďte, ktoré rozvíja u žiakov vyššie kognitívne funkcie.)

strmienok, ~~čapíky,~~ zvukovod, slimák, kladivko, ~~tyčinky,~~ ušnica, ~~sietnica,~~ nákovka, predsieň, polkruhové kanály

• Vonkajšie ucho	• Ušnica, zvukovod
• Stredné ucho	• Kladivko, nákovka, strmienok
• Vnútorné ucho	• Slimák, predsieň, polkruhové kanály

4. V tejto úlohe sa budú nachádzať vety. Na jednotlivé vety budeme odpovedať výberom z možností Áno alebo Nie. Ak si sa rozhodol pre možnosť Nie, tak argumentuj, prečo si si vybral túto možnosť.

(Využívame aktivizujúce sloveso argumentuj, ktoré sa nachádza v Bloomovej taxonómii v hodnotiacom posúdení, teda predstavuje vyššie kognitívne schopnosti žiaka. Pri tejto aktivite musí žiak využívať kritické myslenie.)

Predmety, ktoré sú vo väčšej vzdialenosti, človek nevidí ostro. Tento jav sa nazýva krátkozrakosť?
ÁNO – ~~NIE~~

Predmety, ktoré sú vo väčšej vzdialenosti, človek nevidí ostro. Tento jav sa nazýva ďalekozrakosť?
~~ÁNO~~ – NIE
Argumentuj: Pretože človek, ktorý je ďalekozraký, vidí výborne do diaľky ale objekty, ktoré sú blízko nevidí ostro.

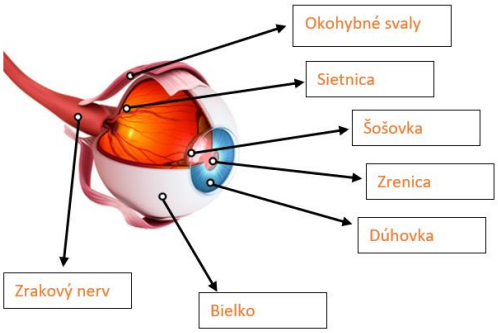
Kooperuje chuť a čuch medzi sebou navzájom?
ÁNO – ~~NIE~~

Má dospelý človek okolo 100 chuťových pohárikov?
~~ÁNO~~ – NIE
Argumentuj: Nie, človek má až okolo 9000 chuťových pohárikov.

Čítajú nevidiaci pomocou Braillovho písma?
~~ÁNO~~ – NIE
Argumentuj: Nie, pretože nevidiaci vnímajú Braillovo písmo pomocou hmatu.

5. Z banky pojmov vyber správne označenie jednotlivých časti a správne ich priraď, ale pozor, nie všetky pojmy sú na obrázku vyznačené.
(V tejto grafickej úlohe rozvíjame nižšie kognitívne funkcie prostredníctvom aktivizujúceho slovesa vybrať, ktoré patrí do aplikácie v Bloomovej taxonómii. Aktivizujúce sloveso priradiť sa zaraďuje do kategórie zapamätanie podľa Bloomovej taxonómie. Prostredníctvom tejto aktivity žiaci rozvíjajú schopnosti kriticky myslieť, čo by sa malo prejaviť pri vyznačovaní jednotlivých časti oka.)

Banka pojmov:
~~cievovka,~~ sietnica, šošovka, ~~rohovka,~~ bielko, zrenica, zrakový nerv, ~~sklovec,~~ dúhovka, okohybné svaly



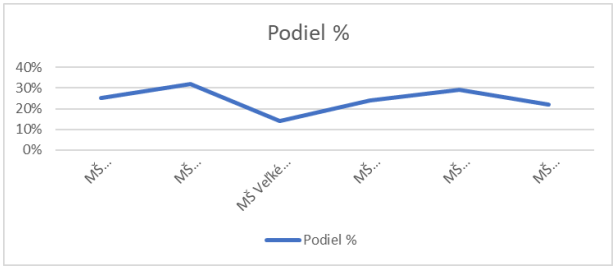
Obr. 4 Oko
Zdroj: [15]

6. V tabuľke sú uvedené údaje o vyšetrení zraku, ktoré sa uskutočnilo vo viacerých materských školách na západnom Slovensku. V rámci tabuľky sú uvedené hodnoty o počte zúčastnených detí a následným vyšetrením sa odporučilo deťom, ktoré nemali dobré hodnoty, navštíviť očného lekára (oftalmológa). Posledný stĺpec obsahuje percentuálne hodnoty, ktoré sú podielom z počtu detí a odporúčaní. Navrhni graf, ktorý bude obsahovať hodnoty z podielu a názov materskej školy z tabuľky.
(Aktivizujúce sloveso navrhnúť začleňujeme do Bloomovej taxonómie v súlade s kategóriou syntéza. Pri tejto aktivite sa rozvíjajú vyššie kognitívne schopnosti žiaka. V druhej časti sa využíva kategória analýzy, ktorá taktiež rozvíjala vyššie kognitívne funkcie pomocou aktivizujúceho slovesa porovnať.)

Materská škôlka	Počet vyšetrených detí	Odporúčanie k oftalmológovi	% podiel
MŠ Kollárova, Malacky	81	20	25%
MŠ Rakárenská, Malacky	68	22	32%
MŠ Veľké Leváre	49	7	14%
MŠ Bilíkova, Bratislava	50	12	24%
MŠ Štúrova, Malacky	75	22	29%
MŠ Hviezdoslavova, Malacky	85	19	22%
Spolu	**408**	**102**	**25 %**

Obr. 5 Meranie zraku
Zdroj: [16]

a) Z tabuľky zisti, aká materská škola mala najväčší podiel percent v rámci merania zraku? Najväčší percentuálny podiel merania zraku mala MŠ Rakárenská v Malackách.
b) Porovnajte medzi sebou hodnoty druhej a piatej MŠ. V obidvoch materských školách je rovnaký počet odporúčaní na vyšetrenie, líšia sa ale tým, že piata škola, MŠ Štúrova v Malackách, mala väčší počet zúčastnených žiakov ako druhá škola, MŠ Rakárenská v Malackách, čo spôsobilo lepší percentuálny podiel.
c) Navrhni graf, ktorý bude obsahovať hodnoty z podielu a názov materskej školy z tabuľky.
Riešenie je graf



Graf 1 Vyšetrenie zraku

7. Doplň do viet slová tak, aby text podával správne poznatky.
(Táto úloha je zostrojená podľa Bloomovej taxonómie, pomocou ktorej získavame informácie o vedomostiach žiakov. Zabezpečuje rozvíjanie nižších kognitívnych

schopností žiaka – porozumenie, cez aktivizujúce sloveso doplň.)

Zmysly – zrak, čuch, ...hmat...., chuť, sluch zabezpečujú prínos podnetov o vonkajšom a ...vnútornom.... prostredí jedinca. Zmyslové vnímanie je dôležité najmä na ...spoznávanie..... blízkeho prostredia, taktiež poskytuje bezpečnosť a radosť zo ...života.... [13].

8. Zdôvodni prečo, dané pojmy nepatria do jedného radu k ostatným a svoje rozhodnutie zdôvodni.

(Podľa Bloomovej taxonómie je úloha zameraná na hodnotiace posudzovanie a na rozvoj kritického myslenia, keďže v úlohe je zadané kritérium – prečo dané pojmy nepatria do daného radu k ostatným. Touto aktivitou sa zabezpečujú vyššie kognitívne schopnosti žiaka.)

a) Čuchové bunky – nos – nosová dutina – ~~nosovo slzný kanálik~~

Zdôvodni: Do tohto radu nepatrí nosovo slzný kanálik, pretože ho zaraďujeme medzi podporné orgány oka. Chráni prednú časť oka pred vysychaním.

b) pokožka – ~~vačky~~ – zamša

Zdôvodni: Vačky do radu nepatria, pretože poskytujú telu informácie o polohe hlavy. Patria ku sluchovému orgánu.

c) vodiaci pes – kontaktné šošovky – ~~posunková reč~~

Zdôvodni: Do radu nepatrí posunková reč, pretože ostatné možnosti napomáhajú ľudom s ochorením zraku a posunková reč je určená pre ľudí, ktorí majú postihnutý sluchový aparát.

d) ~~dysgrafia~~ – nedoslýchavosť – hluchota

Zdôvodni: K daným pojmom nepatrí dysgrafia, pretože to je porucha správneho písania.

9. Najskôr si prečítajte text, následne uvažujte o obsahu daného textu v rámci kritického myslenia. Potom nájdite a opravte chyby v texte.

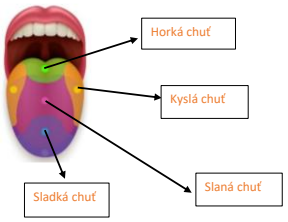
(V tejto úlohe je zabezpečený princíp čítania s porozumením. Ďalej sa tu rozvíja čitateľská gramotnosť. Pri tejto aktivite je potrebné, aby žiaci v rámci aktivizujúceho slovesa kriticky posúdiť určili správnosť textu. Ako ďalšie majú žiaci za úlohu zistiť, kde sa daný nesprávny pojem nachádza a nahradiť ho správnym. Podľa Bloomovej taxonómie cieľov túto úlohu zaraďujeme do kategórie hodnotiace posúdenie a prostredníctvom nej sa zabezpečujú vyššie kognitívne schopnosti žiaka.)

Text	Oprava
„V koži a slizniciach telových otvorov sú receptory na vnímanie ~~čuchu~~, tlaku, chladu, tepla a bolesti. Dráždením týchto receptorov vznikajú aj kombinované pocity, ako je vnímanie hladkosti alebo drsnosti ~~oblizovaného~~ povrchu, vlhkosť, suchosť, tvrdosť, chvenie a svrbenie. V citlivosti, a teda v hustote uloženia ~~predmetov~~, sú na rôznych miestach povrchu tela značné rozdiely. Najcitlivejšia na dotyk a ~~zrak~~ je špička jazyka a končeky prstov na dlaňovej strane, na teplo je najcitlivejšie čelo, na bolesť očná rohovka. Voľné nervové zakončenia, ktoré toto ~~nepociťovanie~~ sprostredkúvajú, sú okrem kože a sliznice takmer vo všetkých tkanivách a orgánoch tela. Preto hovoríme o ~~radosti~~ povrchovej, hlbokej a vnútornostnej.“ Zdroj: [14]	Dotyku Ohmatávaného Receptorov Tlak Pociťovanie Bolesti

10. Z banky pojmov vyber správne označenie jednotlivých častí a správne ich priraď.

(V tejto grafickej úlohe rozvíjame nižšie kognitívne funkcie prostredníctvom aktivizujúceho slovesa vybrať, ktoré patrí do aplikácie v Bloomovej taxonómii. Aktivizujúce sloveso priradiť sa zaraďuje do kategórie zapamätanie podľa Bloomovej taxonómie. Prostredníctvom tejto aktivity žiaci rozvíjajú schopnosti kriticky myslieť, čo by sa malo prejaviť pri vyznačovaní jednotlivých častí jazyka.)

- Banka pojmov
- sladká chuť, kyslá chuť, slaná chuť, horká chuť



Obr 6 Jazyk
Zdroj: [17]

Záver

Všetky úlohy boli v rámci pedagogickej praxe odkonzultované s cvičným učiteľom. Tento rok plánujeme tieto úlohy odskúšať.

Pred vytvorením pracovného listu sme si stanovili ciele, ktoré by mali žiaci dosiahnuť prostredníctvom jednotlivých otázok. Zameriavali sme sa najmä na rozvoj kognitívnych schopností pomocou aktivizačných slovies z revidovanej Bloomovej taxonómie.

Úlohy na pracovnom liste boli prispôsobené vekovej kategórii žiakov 7. ročníka a zamerané na tému zmyslovej sústavy človeka.

Využitím rôznych vyučovacích metód sme zabezpečili pestrosť praktických cvičení, ktoré pomáhali žiakom lepšie a dlhodobo si zapamätať informácie o zmyslovej sústave.

Tvorba pracovného listu na tému zmyslovej sústavy pre 7. ročník bola náročným procesom, kde bola dôležitá dôkladná príprava a zber údajov. Cieľom tejto práce bolo vylepšiť vyučovaciu hodinu pre žiakov 7. ročníka a zabezpečiť ich lepšie porozumenie tejto problematiky.

Poďakovanie

Rada by som vyjadrila svoju vďaku pani konzultantke PaedDr. Anne Sandanusovej, Ph.D., za jej neoceniteľnú pomoc, ochotu a odborné usmernenie pri tvorbe tohto príspevku. Jej cenné rady a korektúry boli pre mňa veľkým prínosom.

Tento príspevok bol vypracovaný v rámci projektu "Zlepšenie praktickej prípravy budúcich pedagogických pracovníkov na UKF v Nitre" (kód ITMS2014+ 312011Z815), ktorý je financovaný zo zdrojov Európskeho sociálneho fondu a Európskeho fondu regionálneho rozvoja v rámci Operačného programu Ľudské zdroje. Bez ich podpory by tento projekt nebol možný.

Použitá literatúra

[1] ČAPEK, R. 2015. Moderní didaktika : lexikon výukových a hodnoticích metod. Praha: Grada Publishing. 604 s. ISBN 978-80-247-3450-7.

[2] NOVÁKOVÁ, Ľ. 2014. Kritické myslenie na 1.stupni ZŠ, stratégia rámca učenia EUR. IN: TUREK, I. 2010. Didaktika. Bratislava: Metodicko-pedagogické centrum v Bratislave. 2014. ISBN: 978-80-8078-322-8 Dostupné z: https://mpc-edu.sk/sites/default/files/projekty/vystup/7_ops_novakova_lubica_kriticke_myslenie_na_1_stupni_zs_strategia_ramca_ucenia_eur.pdf

[3] SITNÁ, D. 2013. Metody aktivního vyučování : spolupráce žáků ve skupinách. Praha: Portál. 150 s. ISBN 9788026204046.

[4] MAGUROVÁ, D. 2011. Využitie vyučovacích metód vo výchovno-vzdelávacom procese pri výučbe problematiky komunikácie. In: Didaktika, roč. 2, č. 1, s. 23-26. ISSN 1338-2845.

[5] ONDRÍKOVÁ, E. 2018. Komunikácia a jej špecifiká. In Vychovávateľ, roč. 66, č. 1-2 , 48-54 s. ISSN 0139-6919.

[6] CINQUAIN. 2010. A scholarly expolation of the American cinquain as popularized by Adelaide Crapsey. [online]. [cit. 24.2.2024]. Dostupné z: http://www.cinquain.org/

[7] ZORMANOVÁ, L. 2012. Výukové metody v pedagogice: tradiční a inovativní metody, transmisivní a konstruktivistické pojetí výuky, klasifikace výukových metod. Praha: Grada. 155 s. ISBN 978-80-247-4100-0.

[8] KOLODJI, D. 2005. The SP Quill Quarterly Magazine. [online]. [cit. 25.2.2024]. Dostupné z: http://www.shadowpoetry.com/resources/wip/cinquain.html

[9] KOVÁČOVÁ, A. 2015. E-U-R ako trojfázový model učenia. In: Projekt STEP AHEAD. [online]. [cit. 28.2.2024]. Dostupné z: http://projektstepahead.sk/interaktivneobrazovky/vytvor_si/EUR_model.pdf

[10] STEELE, J. L. 1997. Čtením a psaním ke kritickému myšlení. Příručka II, Rozvíjíme kritické myšlení. Praha: Kritické myšlení. 59 s.

[11] GRECMANOVÁ, H. - URBANOVSKÁ, P. 2007. Aktivizační metody ve výuce, prostředek ŠVP. Olomouc: Hanex. 180 s. ISBN 80-85783-73-8.

[12] SIEGLOVÁ, D. 2019. Konec školní nudy : didaktické metody pro 21. století. Praha: Grada. 336 s. ISBN 978-80-271-2254-7.

[13] UHEREKOVÁ, M. 2011. Biológia : pre 7.ročník základnej školy a 2 ročník gymnázia s osemročným štúdiom. Bratislava: EXPOL Pedagogika s.r.o. 135 s. ISBN 978-80-8091-549-0.

[14] Biopedia: Zmyslové orgány. [online]. Biopédia: 2024. [cit.24.2.2024]. Dostupné z: https://biopedia.sk/clovek/zmyslove-organy

Zdroj obrázky:

[15]https://wordwall.net/cs/resource/30834744/stavba-oka-5-t%C5%99%C3%ADda

[16] https://www.ludiapremalacky.sk/print/v-ocnych-ambulanciach-pribudlo-skolkarov-/

[17]https://www.tvojezdravie.sk/liecba/top-zaujimavosti-o-ludskom-jazyku-moze-nas-upozornit-na-chorobu-/20234

Tvorba úloh podporujúcich kritické myslenie pre žiakov gymnázia na tému Pohybová sústava človeka

Creation of tasks supporting critical thinking for high school students on the topic Human locomotor system

Artem Kravchenko[1]
Školiteľ : Anna Sandanusová[1]
[1]Katedra zoológie a antropológie, FPV UKF v Nitre, Nábrežie mládeže 91, 949 74 Nitra
artem.kravchenko@student.ukf.sk, asandanusova@ukf.sk

Abstrakt
Cieľom tejto práce bolo vytvoriť pracovný list o svaloch, ako aj niekoľko neštandardizovaných aktivít týkajúcich sa ľudskej kostry. Materiály boli vytvorené podľa ISCED s prihliadnutím na Bloomovu taxonómiu kognitívnych cieľov. Teoretická časť predstavuje problematiku moderného problémového vyučovania. Opísaná je metodika práce, uvedené sú aktivity a pracovný list s uvedením správnych odpovedí k úlohám a s doplňujúcim popisom ku každej. Tieto úlohy väčšinou podporujú vyššie kognitívne procesy (analýzu, hodnotenie a syntézu). Materiály vytvorené v rámci tejto práce možno použiť na upevnenie a overenie vedomostí žiakov, ako aj na ich motiváciu k ďalšiemu poznávaniu biológie človeka. Pri tvorbe učebných materiálov autor konzultoval aj s PaedDr Monikou Krnáčovou, učiteľkou biológie na Spojenej škole svätého Jozefa Kalazanského v Nitre. Predložený pracovný list a aktivity je možné implementovať do bežnej praxe ako súčasť vyučovacieho procesu v kurze biológie človeka.

Predložená práca vznikla v rámci projektu „Skvalitňovanie praktickej prípravy budúcich pedagogických zamestnancov na UKF v Nitre“ (kód ITMS2014+ 312011Z815). Tento projekt sa realizuje vďaka podpore Európskeho sociálneho fondu a Európskeho fondu regionálneho rozvoja v rámci Operačného programu Ľudské zdroje.

Kľúčové slová: pohybová sústava, svaly, kostra, problémové vyučovanie, aktivity, kognitívne ciele.

Úvod

V súčasnosti je nedostatok neštandardných učebných pomôcok. Pracovný list uvedený v tomto článku, ako aj ukážkový aktivít, sú vhodným doplnkom k preberaniu témy Pohybová sústava človeka. Hlavným prínosom je kombinácia úloh rôznej úrovne náročnosti. Komplexný prístup k vypracovaniu úloh pomáha lepšie zhodnotiť vedomosti žiaka. Sme presvedčení, že pri tvorbe pomocných učebných materiálov, ako aj pri tvorbe aktivít je nevyhnutné vychádzať z problémového učenia.
V priebehu riešenia problémových úloh a práce s kazuistickými úlohami sa aktivizuje kritické myslenie. Žiak musí byť schopný analyzovať situáciu, zhodnotiť možné varianty, syntetizovať informácie ako odpoveď na viacstupňovú otázku.
Dôležité je tiež naučiť žiakov pracovať s textom a grafickými úlohami. Tieto typy úloh sú zahrnuté aj v pracovnom liste v tomto článku.

1 Rozvoj kritického myslenia a problémové vyučovanie

Základy kritického myslenia položil antický filozof Sokrates. Prišiel s teóriou, že je veľmi dôležité klásť si hlboké otázky a premýšľať nad tým ako prijímame myšlienky a presvedčenia [1].
Za základné charakteristiky kritického myslenia sa považujú:
1) Dôveryhodnosť: Zdroje informácií sa musia kontrolovať a overovať.
2) Analyzovateľnosť: Popis získavania údajov a tvorby záverov musí byť dostatočne podrobný, aby ho ostatní mohli replikovať.
3) Transparentnosť: žiadne údaje a postupy nie sú vynechané ani skryté (napr. preto, že nezodpovedajú schéme)
4) Užitočnosť: Výsledky myslenia rozširujú naše vedomosti a každodennú prax [2].
Je dôležité implementovať vyučovacie metódy zahŕňajúce autonómne učenie aj inštrukčné aktivity a meniť úroveň otvorenosti experimentálnych úloh. Implementácia modelov aktívneho učenia sa na základe problémov má pozitívny vplyv na študijné výsledky žiakov a ich postoj k prírodovedným predmetom [3].
Problémové vyučovanie zahŕňa prvky problémových úloh, ktoré dopĺňajú rôzne typy úloh v edukácii. Problémové úlohy môžu vytvárať situácie, ktoré vyžadujú dlhodobejšie riešenie a môžu zahŕňať kooperatívne vyučovanie. Proces riešenia problému zahŕňa etapy od nastolenia problému až po

vyriešenie, pričom žiak aktívne pracuje ako bádateľ [4].

2 Materiál a metodika

Autor si preštudoval literatúru o problémovom vyučovaní, moderných základoch a metódach vyučovania biológie. V priebehu preštudovania materiálu vznikol nápad vytvoriť pracovný list s niekoľkými typmi zaujímavých, neštandardných úloh, ako aj vypracovať niekoľko aktivít na overenie a upevnenie vedomostí žiakov. Pri tvorbe úloh sa autor riadil štátnym vzdelávacím programom ISCED 3A.

Úlohy sú rozdelené do niekoľkých kategórií, ako sú úlohy so zápornou otázkou, úlohy na priraďovanie, úlohy na rozpoznanie, grafické úlohy, úlohy na doplnenie textu, úlohy na analýzu textu s cieľom určiť pojem, analýzu textu s cieľom nájsť chyby, problémové úlohy, kazuistické úlohy, a úlohy, ktoré zahŕňajú porozumenie, analýzu a syntézu súčasne.

Pri písaní článku autor konzultoval s metodičkou Katedry zoológie a antropológie UKF v Nitre PaedDr. Annou Sandanusovou, Ph.D. a učiteľkou biológie na Piaristickej spojenej škole sv. Jozefa Kalazanského v Nitre, PaedDr. Monikou Krnáčovou.

3 Výsledky a diskusia

Nižšie je uvedený pracovný list, ktorý obsahuje 10 úloh rôznej náročnosti, a 3 aktivity, ktoré sa môžu realizovať počas vyučovacej hodiny.

Pri každej úlohe v pracovnom liste sú uvedené maximálne možné body, očakávaná odpoveď na úlohu a jej opis. Pri aktivitách je takisto uvedené očakávané riešenie a opis aktivity.

3.1 Pracovný list: Pohybová sústava

1) Ktorý z uvedených typov svalov existuje v skutočnosti (podľa funkcií)? **(1b)**

   a) Hladké svaly

   b) Nerovné svaly

   c) Krvné svaly

   d) Špirálové svaly

Správne riešenie: *a) Hladké svaly*

Kategória: *Rozpoznanie (Pamätanie), je to úloha rozvíjajúca nižšie kognitívne schopnosti žiakov.*

Aktivizujúce slovo*: „ktorý“.*

Cieľ: *žiak vie rozpoznať a identifikovať správny názov na základe poznatkov o rozdelení svalov podľa funkcií.*

2) Ktoré svaly *nepatria* medzi svaly krku? **(1b)**

   a) nadjazylkové svaly

   b) podjazylkové svaly

   c) mimické svaly

   d) kývač hlavy

Správne riešenie: *mimické svaly*

Kategória: *Je to úloha na porozumenie. Náročnosť úlohy zvyšuje aj záporná otázka „**ktoré svaly nepatria**“.*

Cieľ: *žiak vie rozpoznať, ktoré z uvedených svalov nie sú svalmi krku.*

3) Zhodnoť a vyber správne pojmy, doplň ich do textu, aby text dával pravdivú informáciu **(2b)**:

Perimysium

Kĺby

Endomysium

Myokard

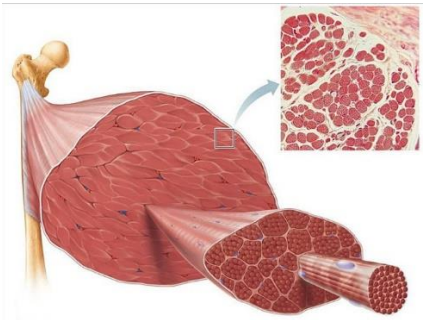
Epimysium

Obal

Ekzomysium

Snopce

“Svalové vlákna sa ďalej združujú do svalových … obalených spojivovým väzivom - … V rámci svalového snopca je priestor medzi jednotlivými svalovými vláknami vyplnený vrstvou bohato prekrveného riedkeho väziva -… Viacero svalových snopcov dohromady tvorí celý sval obalený väzivovou vrstvou – …”



Zdroj: [5]

Správne riešenie:

“Svalové vlákna sa ďalej združujú do svalových snopcov obalených spojivovým väzivom – perimysiom. V rámci svalového snopca je priestor medzi jednotlivými svalovými vláknami vyplnený vrstvou bohato prekrveného riedkeho väziva – endomysia. Viacero svalových snopcov dohromady

tvorí celý sval obalený väzivovou vrstvou – epimysiom".

Kategória: *Úloha na hodnotenie, kritické myslenie, rozvíja vyššie poznávacie schopnosti žiakov.*

Aktivizujúce sloveso*: „zhodnoť a vyber správne pojmy..."*

Cieľ: *žiak vie aplikovať znalosti o štruktúre svalov a ich zložení na úplne doplnenie textu s použitím správnych pojmov.*

4) Svaly sa spravidla zužujú do úponov, pomocou ktorých sa pripájajú ku koži a ku kostiam a zabezpečujú tak pohyb. Jedna z najznámejších týchto štruktúr je pomenovaná po mytologickom hrdinovi Achillovi. Identifikuj, aký názov máju tieto úpony? **(1b)**

Správne riešenie: *Šľachy*

Kategória: *Analýza, kritické myslenie. Úloha rozvíja vyššie kognitívne schopnosti žiakov, je problémovou úlohou.*

Aktivizujúce sloveso*: „identifikuj"*

Cieľ: *žiak vie rozpoznať a identifikovať štruktúry, ktoré súvisia s pohybovou sústavou.*

5) Úlohou bude analyzovať text a určiť názov svalu opísaného nižšie **(1b)**:

Toto je najväčší dýchací sval v tele. Nachádza sa tesne pod rebrami, prilieha k tráviacim orgánom a pľúcam a oddeľuje dýchacie orgány od tráviacich orgánov, oddeľuje hrudnú dutinu od brušnej dutiny. Je to priečne pruhovaný sval ovládaný vôľou.

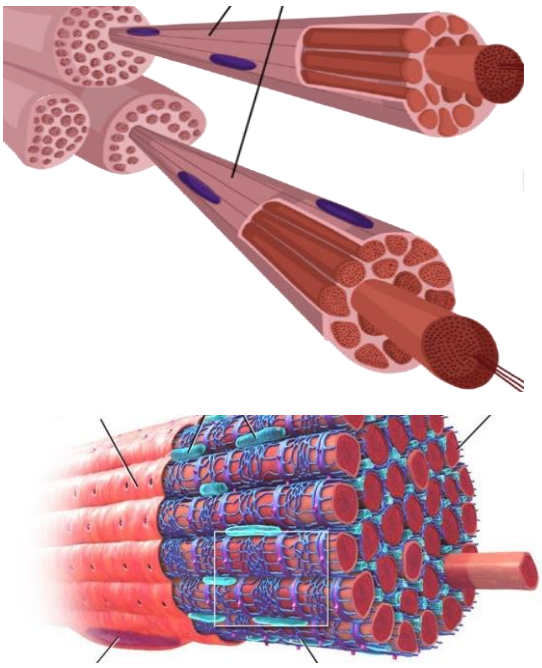
Správne riešenie: *Bránica*

Kategória: *Analýza, kritické myslenie. Úloha na vyššie kognitívne schopnosti.*

Aktivizujúce sloveso*: „analyzovať text a určiť názov svalu..."*

Cieľ: *žiak vie rozpoznať a určiť svaly a skupiny svalov podľa ich funkcií na základe popisu charakteristík.*

6) Identifikuj, ako sa nazýva jednotka kostrového svalstva znázornená na obrázku? **(1b)**



Zdroj: [6,7]

Správne riešenie: *Svalové vlákno*

Kategória: *Rozpoznanie (Pamätanie)*

Aktivizujúce sloveso*: „Identifikuj"*

Cieľ: *žiak vie identifikovať názov jednotky kostrového svalstva zobrazeného na obrázku.*

7) Pripoj názov svalu ku skupine, do ktorej patrí. Všimni si, že nie každá skupina má pár. **(2b)**

1. očný kruhový sval	a) Svaly hrudníku
2. kývač hlavy	b) Svaly hlavy
3. kosoštvorcové svaly	c) Svaly krku
4. veľký prsný sval	d) Svaly chrbta
	e) Svaly brucha
	f) Svaly ramien

Správne riešenie:

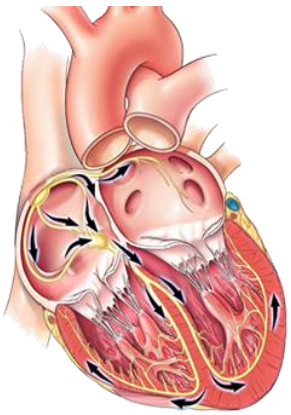
1. očný kruhový sval	*b) Svaly hlavy*
2. kývač hlavy	*c) Svaly krku*
3. kosoštvorcové svaly	*d) Svaly chrbta*
4. veľký prsný sval	*a) Svaly hrudníku*

Kategória: *Analýza, hodnotenie. Úloha na kritické myslenie, rozvíja vyššie kognitívne funkcie. Náročnosť je v tom, že nie každá skupina má pár.*

Aktivizujúce sloveso*: „Pripoj názov"*

Cieľ: *žiak vie klasifikovať uvedené svaly na základe ich skupín a priraďovať ich k správnym kategóriám, posúdiť presnosť svojich rozhodnutí pri pripájaní názvov ku kategóriám.*

8) A) Uveď názov svalu orgánu zobrazeného na obrázku



Zdroj: [8]

B) Opíš funkciu tohto svalu a uvedz aspoň jeden príklad rizika, spojeného s fungovaním tohto svalu. **(3b)**

Správne riešenie:

A) Myokard.

B) Srdcový sval, ktorý umožňuje kontrakciu srdca, čím spôsobuje pumpovanie krvi. Podporuje cirkuláciu krvi v celom tele. Udržiava srdcový tep. Myokard musí byť dobre zásobovaný krvou, aby si zachoval svoju funkciu. Koronárne artérie sú cievy, ktoré zásobujú myokard krvou a kyslíkom. Ak sú tieto cievy blokované alebo poškodené, môže to viesť k ischemickým problémom, ako je napríklad infarkt myokardu.

Kategória: *Úloha na kritické myslenie, na hodnotenie, rozvíja vyššie kognitívne schopnosti.*

Aktivizujúce sloveso*: „uveď názov“ a „opíš“*

Cieľ: *žiak vie identifikovať názov svalu spojeného s konkrétnym orgánom, zhodnotiť a uviesť jeho funkciu.*

9) Juraj dostal za úlohu opísať fungovanie kostrových svalov, ale v každej vete urobil 1 chybu. Analyzuj text, a pomôž Jurajovi opraviť text tak, aby bol pravdivý. Keď nájdeš chybu, podčiarkni to v texte a následne napíš správne slovo do stĺpca s názvom „Správne odpovede“. Celkovo v texte sa nachádza 6 chýb. **(3b)**

Text s chybami	**Správne Odpovede**
Priečne pruhované svaly sú ~~nespôsobilé~~ na ťah, preto pracujú vždy v protiľahlých pároch. Činný sval je ~~menej~~ prekrvený, látková premena sa zvyšuje podľa intenzity činnosti. Pohyby v kĺboch zabezpečuje vždy ~~jeden~~ sval. Ak sa pridlho cvičí či pracuje, svaly začnú bolieť, ale ~~neunavia sa~~. Svalovej únave sa najlepšie predchádza ~~celkovou stálosťou~~ telesnej zdatnosti. Cvičením možno priečne pruhované svaly zväčšiť – svaly nepribudnú, ale ich vlákna ~~sa stanú mäkšími~~ a zosilnejú.	*Prispôsobené* *viac* *viacero (svalov)* *a unavia sa* *celkovým zvyšovaním* *zhrubnú*

Kategória: *Analýza (Hodnotenie), kritické myslenie, rozvoj vyšších kognitívnych schopností*

Aktivizujúce sloveso*: „analyzuj“, „opraviť“, „napíš správne slovo“*

Cieľ: *žiak vie čítať s porozumením, analyzovať text a identifikovať konkrétne chyby v jednotlivých vetách, následne ich opraviť.*

10) Prečítaj si text, pozri sa na obrázok. Urči názov štruktúry zvýraznenej na obrázku a navrhni liečbu javu opísaného v kazuistike. **(3b)**

Kazuistika: Toto je najväčšia šľacha v tele. Spája naše lýtkové svaly s pätnou kosťou a je veľmi namáhaná pri chôdzi, behu, stúpaní po schodoch, skákaní a státí na špičkách. Aj keď táto šľacha vydrží veľkú záťaž z behania a skákania, je tiež náchylná na tendinitídu – zápal, ktorý často prechádza do tendinopatie – chronická bolesť spojená s namáhaním a degeneráciou.



Zdroj: [9]

Správne riešenie: *ide o Achillovu šľachu. Možnosti liečby:*

1) oddych: zníženie alebo zastavenie aktivít, ktoré bolesť zhoršujú;

2) umiestnenie ľadu na najbolestivejšie miesto: toto je užitočné a je možné to vykonávať podľa potreby po celý deň. Môže to byť až 20 minút a malo by sa zastaviť skôr ako dôjde k znecitliveniu pokožky;

3) cvičenie: strečing lýtkových svalov, excentrické posilňovanie, obojstranný pokles päty;

4) chirurgia, keď nechirurgické metódy nepomáhajú po 6 mesiacoch liečby.

Kategória: *Hodnotenie, rozpoznávanie a syntéza, kritické myslenie, rozvoj vyšších kognitívnych schopností*

Aktivizujúce sloveso*: „prečítaj“, „pozri sa“, „urči“, „navrhni“*

Cieľ: *žiak vie čítať s porozumením, analyzovať text, určiť pojmy, nahrnúť riešenie a popísať postup.*

3.2 Aktivity k téme Kostra človeka

1) Vláčik kostí

Počet: celá trieda

Čas: 3 min.

Pomôcky: kartičky s číslom a oddielom chrbtice

Predstavme si, že chrbtica je vlak zložený z niekoľkých vagónov. Každý žiak dostane kartičku s chrbticou a číslom stavca (na jednej kartičke môže byť niekoľko čísel, v závislosti od počtu žiakov v triede). Úlohou žiakov je zoradiť "vagóny" v správnom poradí v priebehu 3 minút.

Správne riešenie: *Najprv idu krčné stavce C1-C7, potom hrudné stavce Th1—Th12, potom bedrové stavce L1—L5, potom krížové stavce S1-S5 a nakoniec kostrčové stavce Co1-Co5. Mal by to byť "vlak" od C1 po Co 4(5).*

2) Zhluk

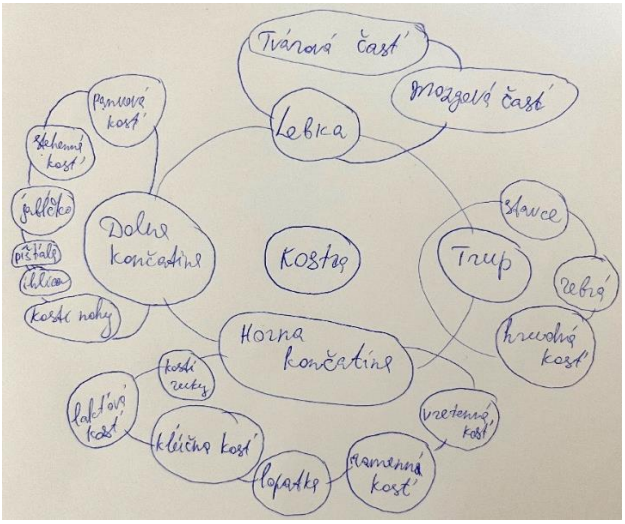
Počet: niekoľko dobrovoľníkov

Čas: 12 min.

Pomôcky: krieda a tabuľa

Na záver hodiny učiteľ nakreslí na tabuľu slnečnú sústavu, napíše "kostra", kde by malo byť Slnko, a žiaci striedavo dopĺňajú túto "slnečnú sústavu": planéty sú oddelenia kostry a ich satelity sú kosti.

Správne riešenie:



Zdroj: [10]

3) Pamätám si alebo nepamätám si

Počet: celá trieda

Čas: 10 min.

Pomôcky: pero a zošit

Učiteľ postupne pomenuje kosti, a žiaci úprimne napíšu, či si pamätajú, z ktorého oddelenia kosť je (čuchová kosť, dolná nosová mušľa, nosová kosť, 5 krížových stavcov, hrudná kosť, kľúčna kosť, lopatka). Po diktáte vyjde jeden dobrovoľník, ktorý ukáže na modeli kostry, kde sa nachádzajú uvedené kosti.

Správne riešenie: *Čuchová kosť – lebka, dolná nosová mušľa – lebka, nosová kosť – lebka, 5 krížových stavcov – chrbtica, hrudná kosť – trup (hrudník), kľúčna kosť, lopatka - kosti hornej končatiny (kosti pletenca ramena).*

Záver

Vypracované úlohy slúžia ako doplnkový materiál na spracovanie témy Pohybová sústava človeka v rámci predmetu biológia. Aktivity sú určené na realizáciu priamo počas vyučovacej hodiny. Pracovný list možno využiť ako materiál na priebežné hodnotenie žiakov, zdroj neštandardných úloh z biológie človeka, ale aj ako materiál na hodnotenie úrovne kritického a neštandardného myslenia žiakov.

Poďakovanie

Vyslovujem srdečné poďakovanie pani školiteľke PaedDr. Anne Sandanusovej, Ph.D. za pomoc a odborné vedenie, ochotný prístup, užitočné rady a usmernenia, za jej čas a trpezlivosť a za rady pri koncipovaní predkladaného článku. Poďakovanie patrí aj pani učiteľke biológie PaedDr. Monike Krnáčovej za ochotný prístup, konzultácie a spoluprácu pri tvorbe tohto článku. Práca je súčasťou projektu „Skvalitňovanie praktickej prípravy budúcich pedagogických zamestnancov na UKF v Nitre“ (kód ITMS2014+ 312011Z815). Tento projekt sa realizuje vďaka podpore Európskeho sociálneho fondu a Európskeho fondu regionálneho rozvoja v rámci Operačného programu Ľudské zdroje.

Zdroje

[1] SANDANUSOVÁ, Anna a SCHLARMANNOVÁ, Janka. 2020. Kritické a tvorivé myslenie v príprave učiteľov biológie. 1. vyd. Nitra : UKF, 2020. 75 s. ISBN: 978-80-558-1637-1.

[2] HVORECKÝ, Jozef. 2021. Kritické myslenie: Integrácia faktov a reality. Inštitút duševnej práce. https://www.institutdusevnejprace.sk/2021/06/04/kriticke-myslenie-integracia-faktov-a-reality/

[3] AKINOĞLU, Orhan, TANDOĞAN, Ruhan Özkardeş. The Effects of problem-based active learning in science education. Eurasia J.Math. Sci. Technol. Educ. 2007;3:71–81. ISSN: 1305-8223. ISSN: 1305-8223.

[4] FRYKOVÁ Erika a kol. 2014. Inovatívne postupy vo vyučovaní biológie. Metodicko-pedagogické centrum v Bratislave. 58 str. ISBN: 978-80-8052-587-3

Zdroje obrázkov

[1]https://www.fitnesstreneri.sk/images/data/Stvaba-svalu-1.jpg

[2]https://o.quizlet.com/WMyGJ4h1kiv-7G4Q7rb31g.png

[3]https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/6b/Skaidula.jpg/800px-Skaidula.jpg?20141212113823

[4]https://www.techmed.sk/ekg-kniha/obr/918/subsidiary-pacemaker.png

[5]https://s6q4k8c8.rocketcdn.me/wp-content/uploads/2018/05/beh2.jpg

[6] Kravchenko A. (2024), Aktivita „Zhluk“.

Monitoring vodných tokov na príklade Tajovského potoka a Bystrice

Monitoring of water streams in using of Tajovský potok and Bystrica

Lucia Mojžitová[1]
Školiteľka: Lenka Balážovičová[1]
[1]Katedra geografie a geológie, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica
lucia.mojzitova@student.umb.sk, lenka.balazovicova@umb.sk

Abstrakt

Voda patrí k základným zložkám krajiny a aj vďaka nej je možný život na Zemi. Poskytuje vhodné podmienky pre život živočíchov, rastlín, ale je taktiež potrebná pre život človeka. V blízkosti vodných tokov v mestách vznikajú zóny vhodné pre oddych a rekreáciu, ale aj skrášľujú okolie okolo zástavby. Človek si však nie vždy uvedomuje silu a význam vodných tokov, a preto ich častokrát znečisťuje, mení korytá riek za účelom ochrany pred povodňami alebo kvôli realizácii výstavby. Na území mesta Banská Bystrica sa nachádza niekoľko vodných tokov, z ktorých sú niektoré zmenené viac a niektoré menej. Práve na toto sme sa chceli v našom príspevku zamerať a poukázať na vplyvy týchto zmien.

V príspevku prezentujeme výsledky z terénneho monitoringu vodných tokov v meste Banská Bystrica, konkrétne Tajovského potoka a Bystrice. Vykonali sme mapovanie korýt, brehovej vegetácie a venovali sme sa aj chemickej analýze a bioindikácii vody.

Kľúčové slová: vodný tok, hydromorfológia, brehová vegetácia, chemická analýza, bioindikácia

Abstract

Water is one of the basic components of the country, and thanks to it life on Earth is possible. It provides the rights conditions for animals and plants, but it is also necessary for human life. In the vicinity of water streams in cities, areas suitable for relaxation and recreation are emerging, but they also beautify the surroundings around the building. However, people sre not always realise the power and importance of water streams, and therefore often pollutes them, change the riverbeds in order the protect it from floods or to carry construction. In Banská Bystrica there are several the water streams, some of which are change more and some less. This is what we wanted to focus on our article on and highlight the effects of these changes.

In this article we present the results of the field monitoring of rivers in the city of Banská Bystrica, namely Tajovský brook and Bystrica. We carried out mapping of riverbeds, bank vegetation and we also carried out chemical analyses and bioindication of water.

Key Words: streams, hydromorphology, riparian vegetation, chemical analysis, bioindication

Úvod

Vodný tok je podľa zákona 364/2004 Z. z. o vodách a o zmene zákona Slovenskej národnej rady č. 372/1990 Zb. o priestupkoch v znení neskorších predpisov (vodný zákon) definovaný ako „vodný útvar trvalo alebo občasne tečúcich povrchových vôd po zemskom povrchu v prirodzenom koryte alebo v umelom koryte, ktoré je jeho súčasťou, a ktorý je napájaný z vlastného povodia alebo z iného vodného útvaru. Vodným tokom sú aj vody v slepých ramenách, mŕtvych ramenách a odstavených ramenách, ak sú ovplyvňované hydrologickým režimom vodného toku, ako aj vody umelo vzduté v koryte. Vodným tokom zostávajú aj povrchové vody, ktorých časť tečie pod zemským povrchom alebo zakrytými úsekmi“ [1]. Z daného zákona vyplýva, že vodný tok je aj vtedy, ak je koryto vodného toku umelé alebo upravené. Z tohto dôvodu sme si pre náš výskum zvolili dve lokality, kde tento rozdiel v prirodzenom a umelom koryte sa dá pozorovať.

Keďže sa vodné toky nachádzajú aj v mestách, tak často v ich blízkosti nájdeme aj množstvo odpadu, ktorý tam rozhodne nepatrí. Človek si postupne prestáva vážiť zdroje, ktoré mu poskytuje planéta Zem, a preto prispieva aj k poškodzovaniu vodných tokov. Môže sa jednať o znečisťovanie odpadom, chemickými látkami, alebo vypúšťaním odpadových vôd z čističiek odpadových vôd. Keďže sa v posledných rokoch častokrát stretávame s informáciami o znečisťovaní vodných tokov a ich následným poškodením a úhynom rôznych druhov rýb a živočíchov, tak sme sa touto tematikou inšpirovali a chceli sme zistiť stav vodných tokov v našom okolí.

Našťastie máme štátne organizácie, občianske združenia a množstvo dobrovoľníkov, ktorí sa snažia o zachovanie čistoty vodných tokov, o ich ochranu a monitorovanie. Je aj množstvo rôznych programov zameraných na túto problematiku, pričom sa jedná o odborné programy a prípravu alternatív k štátnym koncepciám, ako napr. MVO Ľudia a voda, Strom života, Združenie Slatinka, Občianske združenie SOSNA [2]. Tiež sa do ochrany a monitorovania vodných tokov môže zapojiť aj široká verejnosť vďaka programom Citizen Science [3].

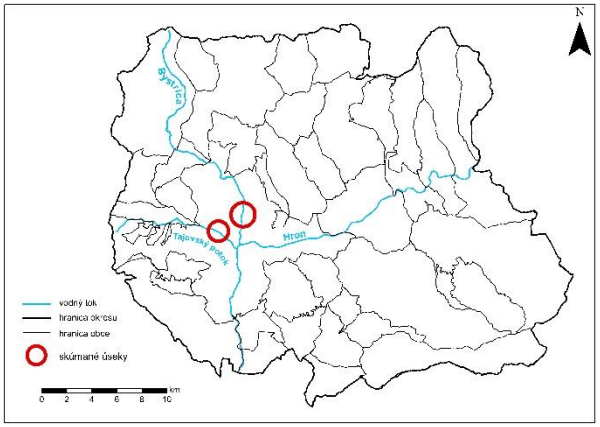
Cieľom našej práce bolo vytvorenie analýzy a porovnanie dvoch vodných tokov na území mesta Banská Bystrica a ich stručná charakteristika. Porovnávali sme vodné korytá, druhy vegetácie nachádzajúce sa v ich blízkosti, chemickú a biologickú analýzu.

1 Vodné toky

Vodné toky sú veľmi dôležité pre život živočíchov ale aj rastlín, ktoré sa nachádzajú v blízkosti vodných tokov. Poskytujú podmienky pre život a pre ľudí plnia aj estetickú funkciu. Aby vodné toky mohli napĺňať všetky svoje funkcie tak ako majú, tak potrebujú mať dobrý stav vody a dobrý ekologický stav. Na základe zákona 364/2004 Z. z. o vodách a o zmene zákona Slovenskej národnej rady č. 372/1990 Zb. o priestupkoch v znení neskorších predpisov (vodný zákon) môžeme dobrý stav povrchových vôd definovať ako „stav útvaru povrchových vôd, ak je jeho ekologický stav a chemický stav aspoň dobrý“ a dobrý ekologický stav povrchových vôd môžeme definovať ako „stav útvaru povrchových vôd určený podľa príslušnej klasifikácie (§ 81 ods. 2)“ [1]. Údaje pre hodnotenie vieme získať aj vďaka Nariadeniu vlády č. 269/2010 z 25. mája 2010 Z. z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na dosiahnutie dobrého ekologického stavu vôd, kde „útvar povrchových vôd je klasifikovaný v dobrom ekologickom stave, ak prvky kvality hodnotenia ekologického stavu sú začlenené vo veľmi dobrom ekologickom stave alebo dobrom ekologickom stave“ [4]. Na základe určenia ekologického stavu môžeme vodné toky zaradiť do 5 kategórií a to od veľmi dobrého ekologického stavu až po veľmi zlý ekologický stav.

Podľa Správy o stave životného prostredia Slovenskej republiky v roku 2022 bolo v povodí rieky Hron sledovaných a hodnotených 27 miest, pričom z toho až 25 miest nespĺňalo požiadavky na kvalitu povrchovej vody na základe prílohy č. 1 Nariadenia vlády SR č. 269/2010 Z. z., časť A a časť E (2022) [5].

Niektoré z potrebných údajov pre hodnotenie stavu poskytujú aj vodomerné stanice v správe SHMÚ, pričom v Banskobystrickom regióne sa nachádza 79 takýchto staníc [6]. Dve zo staníc sa nachádzajú aj na nami vybraných vodných tokoch a to na Tajovskom potoku a Bystrici (obr. 1).



Obr. 1 Poloha Tajovského potoka a Bystrice v rámci okresu Banská Bystrica [zdroj: vlastné spracovanie, podkladová mapa: Atlas krajiny Slovenskej republiky, Hydrogeologická mapa SR 1:50 000]

1.1 Tajovský potok

Tajovský potok patrí do povodia rieky Hron a je aj jej pravostranným prítokom. Pramení vo výške 1 150 m. n. m. na južných svahoch Skalky v Kremnických vrchoch. Povodie sa rozkladá na ploche 47,32 km^2 a má vejárovitý tvar. Nachádza sa v mierne teplej až chladnej klimatickej oblasti, pričom sa priemerná teplota vzduchu pohybuje medzi -3 až -6 °C počas januára a počas júla v rozmedzí 14 až 17 °C [7].

Na nami vymedzenom úseku je tu Tajovský potok v porovnaní s Bystricou obklopený väčším množstvom drevín a v jeho blízkosti sa nachádza zástavba rodinných domov, bytová zástavba, detské ihriská, cyklotrasa spolu s chodníkom pre peších. Vytvorené je tu prijemné prostredie pre rekreáciu ale aj športovanie. Vďaka brehovej vegetácií, ktorej je tu veľké množstvo sa tu počas letných mesiacov vytvára príjemná lokalita s dostatkom chládku (obr. 2).



Obr. 2 Tajovský potok [25.10.2023, foto: autorka]



Obr. 3 Bystrica [3.3.2023, foto: autorka]

Tajovský potok preteká obcou Tajov a odtiaľ už preteká mestskou časťou Podlavice, postupuje okrajom mestskej časti Fončorda. Juhozápadne od centra mesta sa vlieva do rieky Hron vo výške cca 319 m. n. m.

1.2 Bystrica

Bystrica taktiež patrí do povodia rieky Hron a je aj pravostranným prítokom. Pramení v nadmorskej výške 1 280 m. n. m. v južnej časti Veľkej Fatry na úpätí Kráľovej skaly. Povodie sa rozkladá na ploche 160,49 km^2 a má vejárovitý tvar. Dĺžka od prameňa po ústie je 22,9 km. Režim odtoku má snehovo-dažďový. Najväčší prietok má v období jari, kedy sa v horách topí sneh [8]. Do rieky Hron sa vlieva pri Štadlerovom nábreží v Banskej Bystrici. Povodie patrí do mierne teplej až mierne chladnej klimatickej oblasti, kde sa priemerná teplota vzduchu pohybuje v januári okolo -3 °C a v júli okolo 12 - 16 °C.

Na nami vymedzenom úseku sa tu v porovnaní s Tajovským potokom nachádza menšie množstvo vegetácie (obr. 3). V blízkosti sa nachádza zástavba bytových domov a rýchlostná cesta R1. Nenachádza sa tu cyklotrasa ani detské ihriská. Celé koryto na vymedzenom úseku je umelo vybudované z dôvodu výstavby rýchlostnej cesty R1, kedy bolo potrebné presmerovanie vodného toku. Obyvatelia si tu však pravidelne robia akcie na čistenie okolia a taktiež je tu upravený režim kosenia okolia a sú tu aj rôzne náučné tabule o živočíchoch, ktoré sa tu v okolí vyskytujú.

Bystrica preteká obcami Horný Harmanec, Dolný Harmanec, Harmanec, mestskou časťou Uľanka, Jakub, Kostiviarskou, ďalej preteká centrom mesta, kde sa vlieva do rieky Hron vo výške cca 320 m. n. m.

2 Metodika

Monitoring bol zameraný na mapovanie výskytu brehovej vegetácie, pri ktorej sme určovali druhové zastúpenie drevín a hydromorfologické mapovanie korýt vybraných vodných tokov. Ďalšou časťou výskumu bola realizácia chemických analýz a bioindikácia. Odbery vody pre analýzy sa realizovali na každom vodnom toku z troch lokalít.

V prvom kroku sme si vybrali vodné toky, na ktorých sa bude realizovať monitoring a následne sme na každom toku vymedzili úsek s dĺžkou 500 m, kde sme si určili 3 lokality vhodné na odbery. Lokality boli na hornom, strednom a dolnom toku a vybrané tak, aby bolo možné realizovať odbery.

Monitoring sa skladal z dvoch častí. Prvá časť bola zameraná na hydrologické mapovanie vodných korýt a mapovanie výskytu vegetácie. Oba vymedzené úseky sme si prešli a zakreslili si priebeh korýt a tiež aj prvky, ktoré sa v korytách nachádzali. Pri zakresľovaní boli použité symboly podľa štandardných symbolov používaných pri mapovaní riečnych koridorov (NRA, 1992) (obr. 4). Táto časť mapovania prebiehala počas októbra, aby bolo možné zaznamenať drevinové zloženie brehovej vegetácie. V rovnaký deň prebiehalo

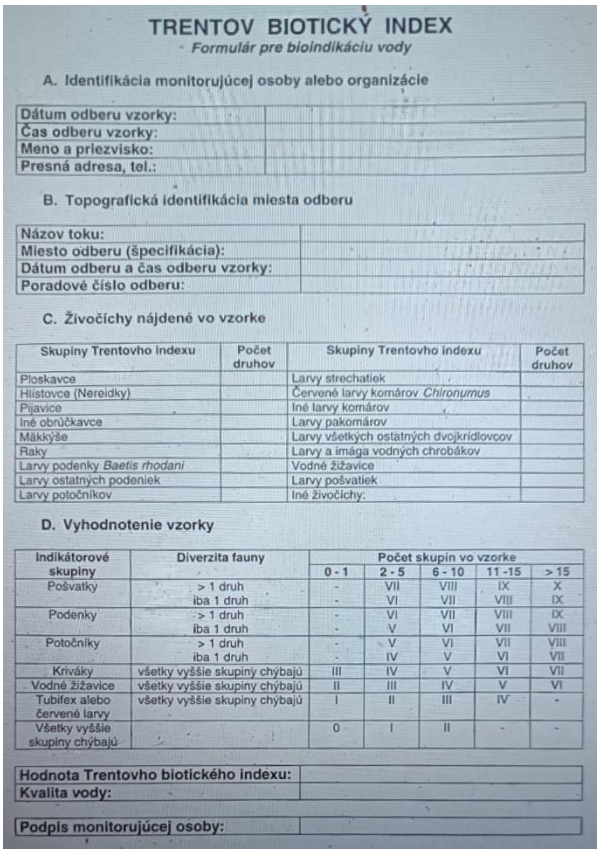
aj mapovanie vegetácie, pri ktorom sme taktiež prechádzali po celej dĺžke vymedzených úsekov po oboch brehoch a zaznamenávali sme druhy vyskytujúce sa v blízkosti brehov. Pri určovaní druhov sme si pomohli aplikáciou PlantNet. V ďalšom kroku sme vytvorili grafy pre oba vodné toky, kde sme uviedli jednotlivé druhy drevín a ich početnosť na oboch brehoch vodných tokov.



Obr. 4 Legenda značiek používaných pri mapovaní riečnych koridorov podľa NRA 1992 [zdroj: Anstead a Barabas 2013]

Druhá časť monitoringu zameraná na realizáciu chemickej analýzy a bioindikáciu prebiehala na hornom, strednom a dolnom toku. Odberné miesta boli vždy na tej istej lokalite, aby bolo možné porovnávať výsledky. Pri chemickej analýze sme sa zamerali na testovanie 14 prvkov, meranie pH vody a teploty vody. Na analýzu sme využívali sadu JBL Testlab set 14 testov. Testovali sme KH, GH, pH 3-10, pH 6,0-7,6, pH 7,4 – 9,0, NH_4, NO_2, NO_3, PO_4 Sensitive, SiO_2, Fe, Cu, O_2, CO_2. Analýzu sme realizovali na mieste odberu vzorky, aby sme minimalizovali možné zmeny vlastností vody. Pre zapisovanie výsledkov meraní bola vytvorená terénna karta, kde sme zaznamenávali výsledky chemickej analýzy, dátum, čas, súradnice odberu, počasie, teplotu vzduchu a vody, výšku vodnej hladiny, pH pomocou digitálneho pH metra a konduktivitu. Výšku vodnej hladiny sme merali pomocou olovničky a šnúry, kedy sme sa postavili pri každom meraní na to isté miesto na mostíkoch. Výšku vodnej hladiny sme však zisťovali aj z vodomerných staníc SHMÚ, ktoré sa na vodných tokoch nachádzajú.

Bioindikáciu sme určovali na základe Trentovho biotického indexu, kedy sme v priebehu 6 mesiacov robili na všetkých odberných miestach odchyt makroskopických bezstavovcov. Na každej lokalite sme realizovali odchyt počas 10 minút, následne sme určili indikátorové skupiny, ich diverzitu a počet skupín vo vzorke a všetky organizmy sme vypustili späť do vodného toku. Ako pomôcka nám slúžil formulár pre bioindikáciu vody a kľúč k určovaniu vodných živočíchov (obr. 5).



TRENTOV BIOTICKÝ INDEX

Formulár pre bioindikáciu vody

A. Identifikácia monitorujúcej osoby alebo organizácie

Dátum odberu vzorky:	
Čas odberu vzorky:	
Meno a priezvisko:	
Presná adresa, tel.:	

B. Topografická identifikácia miesta odberu

Názov toku:	
Miesto odberu (špecifikácia):	
Dátum odberu a čas odberu vzorky:	
Poradové číslo odberu:	

C. Živočíchy nájdené vo vzorke

Skupiny Trentovho indexu	Počet druhov	Skupiny Trentovho indexu	Počet druhov
Ploskavce		Larvy strechatiek	
Hlístovce (Nereidky)		Červené larvy komárov *Chironumus*	
Pijavice		Iné larvy komárov	
Iné obrúčkavce		Larvy pakomárov	
Mäkkýše		Larvy všetkých ostatných dvojkrídlovcov	
Raky		Larvy a imága vodných chrobákov	
Larvy podenky *Baetis rhodani*		Vodné žižavice	
Larvy ostatných podeniek		Larvy pošvatiek	
Larvy potočníkov		Iné živočíchy:	

D. Vyhodnotenie vzorky

Indikátorové skupiny	Diverzita fauny	Počet skupín vo vzorke				
		0 - 1	2 - 5	6 - 10	11 -15	> 15
Pošvatky	> 1 druh	-	VII	VIII	IX	X
	iba 1 druh	-	VI	VII	VIII	IX
Podenky	> 1 druh	-	VI	VII	VIII	IX
	iba 1 druh	-	V	VI	VII	VIII
Potočníky	> 1 druh	-	V	VI	VII	VIII
	iba 1 druh	-	IV	V	VI	VII
Kriváky	všetky vyššie skupiny chýbajú	III	IV	V	VI	VII
Vodné žižavice	všetky vyššie skupiny chýbajú	II	III	IV	V	VI
Tubifex alebo červené larvy	všetky vyššie skupiny chýbajú	I	II	III	IV	-
Všetky vyššie skupiny chýbajú		0	I	II	-	-

Hodnota Trentovho biotického indexu:	
Kvalita vody:	
Podpis monitorujúcej osoby:	

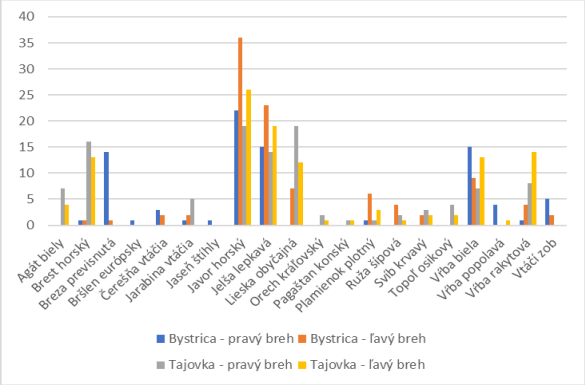
Obr. 5 Formulár pre bioindikáciu vody – Trentov biotický index [zdroj: Milonová a Pado, 2002]

Prvá časť monitoringu prebiehala 7.10.2022 na oboch vodných tokoch, kedy prebiehalo mapovanie korýt a vegetácie. Chemická analýza bola realizovaná počas 12 mesiacoch, pričom odbery boli robené raz mesačne v približne rovnakom čase. Bioindikácia prebiehala počas 6 mesiacov od mája do októbra 2023, kedy sa odbery robili raz mesačne.

3 Výsledky a diskusia

Tajovský potok má v porovnaní s Bystricou viac prírodný charakter, čo nám dokazuje aj mapovanie riečneho koryta. Na vymedzenom úseku sa nachádzalo menej človekom upravených úsekov a celkový charakter dotvára aj množstvo vegetácie v okolí

vodného toku. Človekom upravený tu bol len jeden úsek, v ktorom bol spevnený breh balvanmi a na pár miestach sa nachádzal betón. Na dne sa nachádzali hlavne kamene, štrk alebo bahno. V koryte bolo v porovnaní s Bystricou aj viac perejí čo tiež poukazuje na prírodnejší charakter vodného toku (obr. 6). V sledovanom úseku sa nachádza jedno potrubie prechádzajúce ponad vodný tok a jedna lávka pre peších. Charakter toku dotvára aj brehová vegetácia, z ktorej je najviac zastúpený na pravom brehu javor horský (19) a lieska obyčajná (19). Na ľavej strane prevláda javor horský (26) a za ním nasleduje jelša lepkavá (19) (graf 1).



Graf 1 Drevinové zloženie pravého a ľavého brehu Tajovského potoka a Bystrice [zdroj: autorka]

Bystrica je viac regulovaná ľudskou činnosťou čo nám potvrdzuje jej umelo vybudované koryto. Koryto však bolo upravované a presúvané z dôvodu výstavby rýchlostnej cesty R1 v jeho blízkosti a to sa podpísalo na charaktere tohto toku v nami sledovanom úseku. Breh je spevnený betónom, lomovým kameňom a časť je vybudovaná umelo. Na dne sa nachádzajú väčšinou kamene, lomový kameň alebo štrk. Oproti Tajovskému potoku je tu menej perejí a vytŕčajúcich kameňov obr. 7). Vo vodnom toku nájdeme jeden ostrovček s vegetáciou, ktorý počas vysokých prietokov býva zaplavený. Cez vodný tok prechádzajú dve lávky pre peších, jeden most a potrubie. Na vodnom toku nájdeme niekoľko menších vtokov. Z brehovej vegetácie je na pravom brehu najviac zastúpený javor horský (22) a na ľavom brehu je to tiež javor horský (36) (graf 1).

Pri výsledkoch chemickej analýzy sa nám niektoré ukazovatele menili viac, niektoré nám dokonca vyšli po celý čas výskumu rovnaké. Niektoré výsledky naznačili, že vodné toky nie sú vhodné alebo sú na hranici vhodnosti pre život živočíchov. Výsledky uhličitanovej tvrdosti (KH) nám ukázali, že sa počas roka ich hodnoty menili (graf 2). Tieto hodnoty prekračujú ideálne hodnoty, ktoré sú na hodnote 5 °dH. Hodnoty celkovej tvrdosti (GH) sú tiež pomerne premenlivé (graf 3), ale nachádzajú sa v rozhraní vhodnom pre živočíchy, ktoré je v rozmedzí 8 – 25 °dH. Hodnoty pH sa merali za pomoci troch rôznych testov. Pri testovaní testom pH 3 – 10 sa nám hodnoty držali na rovnakej úrovni a to pH 8,0 (graf 4), čo predstavuje vhodné hodnoty pre život živočíchov. Pri testovaní testom pH 6,0 – 7,6, ktorý je určený ku kontrole hodnôt pri mierne kyslej až neutrálnej sladkej vode sme namerali hodnotu vo všetkých prípadoch 7,6. Pri testovaní testom pH 7,4 – 9,0 (graf 5) sme namerali hodnoty 7,4 – 8,2, ktoré sú vhodné pre život rýb aj rastlín vo vodných tokoch. Amonium/amoniak (NH_4) je živinou pre rastliny a v nízkych koncentráciách nie je pre ryby jedovatý. Namerané hodnoty by mali byť čo najmenšie. V našom prípade sú všetky hodnoty na úrovni <0,05 mg/l, ktoré nám ukazujú, že podmienky sú vhodné v oboch vodných tokoch. Dusitany sú pre ryby silne toxické a nami namerané hodnoty sa pohybovali v rozmedzí <0,01 – 0,1 mg/l (graf 6), a sú teda vhodné pre život rýb. Pri meraní hodnôt dusičnanov (NO_3) sme sa pohybovali v rozmedzí hodnôt <0,5 – 3 mg/l (graf 7). Ideálne hodnoty sa nachádzajú v rozmedzí 1 – 15 mg/l. Hodnoty 3,0 mg/l sme namerali v dvoch vzorkách Bystrice v marci a v júni 2023. Hodnoty fosfátov (PO_4) nám vyšli po celý čas monitoringu na rovnakej hodnote <0,02 mg/l, pričom ideálne hodnoty sú <0,02 – 0,4 mg/l. Obsah kremičitanov (SiO_2) bol vo vzorkách v rozmedzí 0,8 – 6,0 mg/l. Počas februára 2023 sme namerali hodnoty 0,8 – 3 mg/l a po zvyšok roku boli buď 3,0 alebo 6,0 (graf 8). Podľa sady, ktorou sme testovali daný ukazovateľ a je hlavne určená na testovanie akváriovej vody, tak sú ideálne hodnoty <0,1 – 0,8 mg/l. Nami namerané hodnoty výrazne prekračovali vhodné hodnoty, avšak nie sú škodlivé pre živočíchy vo vodných tokoch. Obsah železa sme merali pomocou testu Fe. Vhodné hodnoty sú 0,1 – 0,4 mg/l a my sme namerali vo všetkých prípadoch hodnotu <0,02 mg/l. Obsah medi sme merali za pomoci testu Cu. Namerali sme vo všetkých prípadoch hodnotu <0,05 mg/l, ktorá je v rozmedzí správnych hodnôt. Kyslík (O_2) bol nameraný na hodnotách 8 – 10 mg/l (graf 9), ktoré sú v správnom rozmedzí. Hodnoty oxidu uhličitého (CO_2) sme určovali na základe hodnôt KH a hodnoty pH vody. Ideálne hodnoty sú 15 – 30 mg/l, my sme však namerali hodnoty 3 – 14 (graf 10), ktoré vo väčšine prípadov neboli vhodné.

Výsledky bioindikácie vodných tokov nám naznačili, že Tajovský potok je vhodnejší a čistejší pre život

makroskopických bezstavovcov. Na Tajovskom potoku nám vyšli väčšinou hodnoty 7, čo predstavuje dobrú kvalitatívnu triedu čistoty vodného toku. Na Bystrici tieto hodnoty boli prevažne na hodnote 6, čo je stredná kvalitatívna trieda čistoty vodného toku. Výsledky bioindikácie sa nachádzajú v tab. 1.

Záver

Najviac pozorovateľné rozdiely sa nám prejavili na výzore a charaktere korýt oboch riek. To isté sa týka aj brehovej vegetácie. Na mapovaných úsekoch sa dajú vidieť rozdiely v brehoch, charaktere dna ale aj v množstve perejí. Tajovský potok má prírodnejší charakter a je menej zasiahnutý ľudskou činnosťou. V mapovanom úseku sa nachádza viac meandrov, perejí, vyčnievajúcich kameňov a dno je tvorené prevažne kameňmi alebo štrkom. Jeho charakter dotvára aj množstvo brehovej vegetácie. Koryto vodného toku Bystrica je poznačené výstavbou rýchlostnej cesty R1, kedy bolo koryto umelo prebudované a na niektorých miestach aj presunuté. Koryto je na niekoľkých úsekoch spevnené betónom, alebo dno je umelo vyložené lomovým kameňom. Tieto opatrenia sú spôsobené aj výstavbou lávky pre peších a taktiež cestného mostu. Vodný tok obsahuje menej perejí, menej vytŕčajúcich kameňov a taktiež menej brehovej vegetácie. Vegetácia môže byť ovplyvnená aj blízkosťou rýchlostnej cesty a cesty, ktoré môžu znečisťovať okolie. Avšak na Tajovskom potoku aj na Bystrici bývajú každoročné čistenia vodných tokov a v okolí Bystrice sa nachádzajú aj náučné tabule o živočíchoch, vtáctve a režime kosenia. To znamená, že ľuďom záleží na ich okolí a snažia sa aj o čistotu vodných tokov.

V prípade chemickej analýzy sa hodnoty vo väčšine prípadov nachádzajú v prijateľných hodnotách, ktoré sú vhodné pre život organizmov vo vodných tokoch. Rozdiely môžu byť spôsobené počasím, pretože v zimných mesiacoch sa teploty nachádzali pod bodom mrazu a prietoky boli menšie. Taktiež nie vždy bola možná realizácia meraní priamo na mieste odberu z dôvodu mrazu. Počas letných mesiacov boli prietoky o niečo vyššie a taktiež boli vysoké teploty. Väčšina ukazovateľov bola v oboch vodných tokoch dobrá, avšak našli sa aj rozdiely. Pomerne veľké rozdiely sa dajú pozorovať pri SiO_2 a NO_2, kedy sa nám hodnoty počas mesiacov výraznejšie menili. Kremík sa vo forme kremičitanov do povrchových vôd dostáva zvetrávaním kremeňa. Keďže oba vodné toky pramenia v horách tak ich množstvo nám pri analýze vyšlo mierne zvýšené, čo však v tomto prípade až tak nevadí. V oboch vodných tokoch boli namerané hraničné hodnoty Fe. Hodnoty pH sme však počas celého sledovacieho obdobia mali takmer na rovnakých úrovniach.

Pri bioindikácií sme nezistili závažné znečistenie vodných tokov alebo že by neboli vhodné pre život organizmov. Ani v jednom z odberov sme nezistili ani veľmi dobrú čistotu vody avšak ani zlú alebo na hranici únosnosti. Klesajúce hodnoty sa dajú pripísať mesiacom, kedy sa už zhoršovalo počasie a klesali teploty, a tým pádom dochádzalo k znižovaniu počtu druhov. Vo všetkých prípadoch sme zistili dobrú a strednú kvalitatívnu triedu čistoty vodných tokov.

Poďakovanie

Rada by som sa poďakovala mojej školiteľke Mgr. Lenke Balážovičovej, PhD. za pomoc, vedenie a odborné rady. Taktiež by som sa chcela poďakovať prof. RNDr. Jánovi Spišiakovi, DrSc., doc. RNDr. Zuzane Melichovej, PhD. a Mgr. Romane Schubertovej, PhD. za poskytnutie materiálnej pomoci.

Použitá literatúra

[1] Zbierka zákonov č. 364/2004 (2004) Zákon o vodách a o zmene zákona Slovenskej národnej rady č. 372/1990 Zb. o priestupkoch v znení neskorších predpisov (vodný zákon)

[2] SZABÓOVÁ, S. – PAČENOVSKÝ, S. – SZABÓ, Š. 2002. Občiansky monitoring vody. Košice: SOSNA, 67 s.

[3] SCHUBETOVÁ, R. 2019. Skúmaj svoje okolie. Banská Bystrica: Belianum, 74 s.

[4] Nariadenie vlády Slovenskej republiky 269/2010 z 25. mája 2010 Z. z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na dosiahnutie dobrého stavu vody

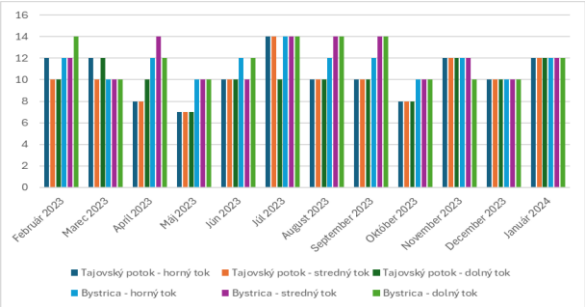
[5] LIESKOVSKÁ, Z. – ANDRÁŠIOVÁ, K. 2022. Bratislava, Banská Bystrica: MŽP SR, SAŽP, 221 s. ISBN 978-80-8213-152-2

[6] Banskobystrický región [Citované: 23.2.2024] https://www.shmu.sk/sk/?page=765&section=rsbb

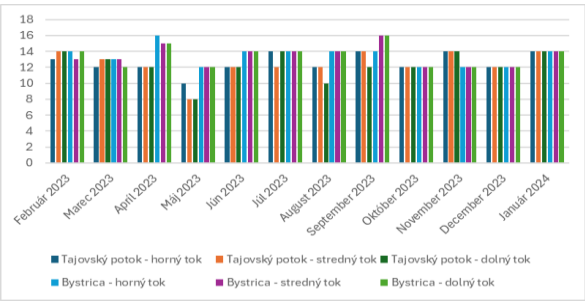
[7] ANSTEAD, L. – BALÁŽOVIČ, Ľ. 2015. Analýza povodní a protipovodňová ochrana na vodných tokoch v obci Tajov. In Geografická revue, roč. 11, č. 1, s. 5-14. ISSN 1336-7072

[8] KONTÚROVÁ, S. – BERACKO, P. 2016. Bionómia pijavice trocheta cylindrica örley, 1886 (hirudinea: erpobdelliformes) v podhorskom úseku potoka Bystrica (Veľká Fatra, Západné Karpaty). In Folia faunistica Slovaca, roč. 21, č. 1, s. 13 – 18. ISSN 1335-7522

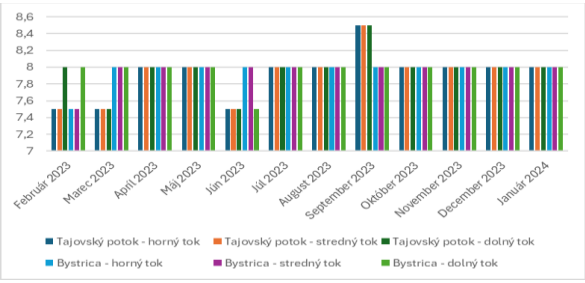
Prílohy



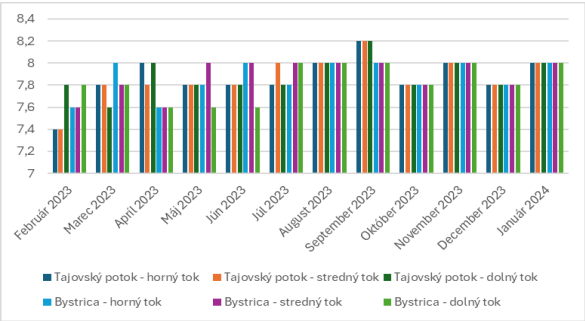
Graf 2 Uhličitanová tvrdosť na vodných tokoch (°dH)[zdroj: autorka]



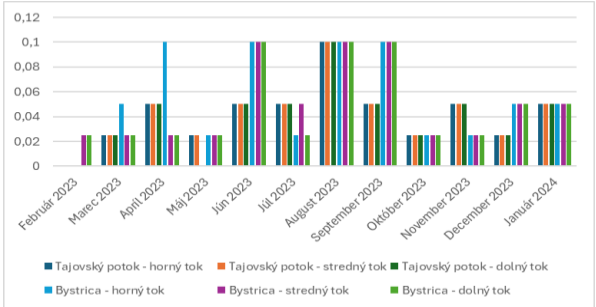
Graf 3 Celková tvrdosť na vodných tokoch (°dH) [zdroj: autorka]



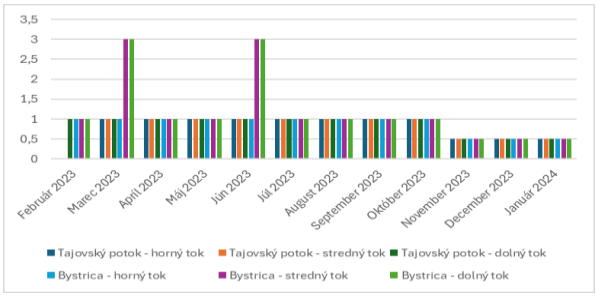
Graf 4 Hodnota pH 3-10 na vodných tokoch [zdroj: autorka]



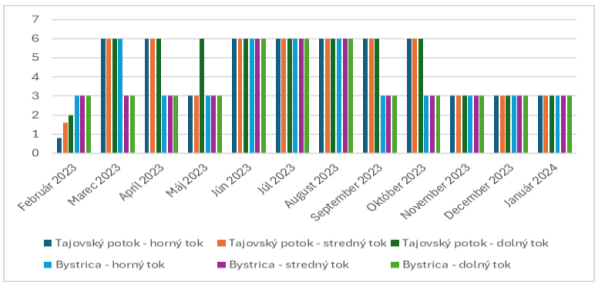
Graf 5 Hodnota pH 7.4-9.0 na vodných tokoch [zdroj: autorka]



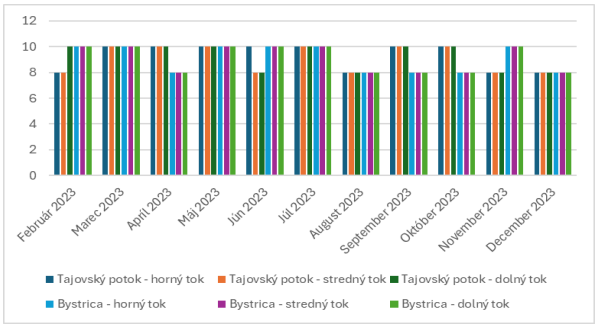
Graf 6 Množstvo dusitanov na vodných tokoch (mg/l) [zdroj: autorka]



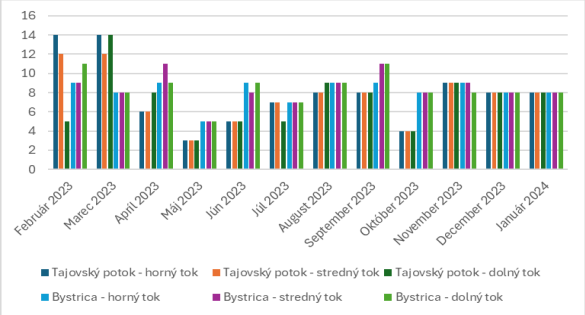
Graf 7 Množstvo dusičnanov na vodných tokoch (mg/l) [zdroj: autorka]



Graf 8 Množstvo kremičitanov na vodných tokoch (mg/l) [zdroj: autorka]



Graf 9 Množstvo kyslíka na vodných tokoch (mg/l) [zdroj: autorka]

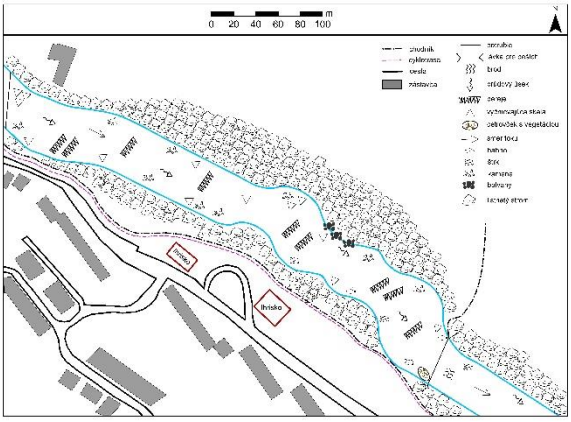


Graf 10 Množstvo oxidu uhličitého na vodných tokoch (mg/l) [zdroj: autorka]

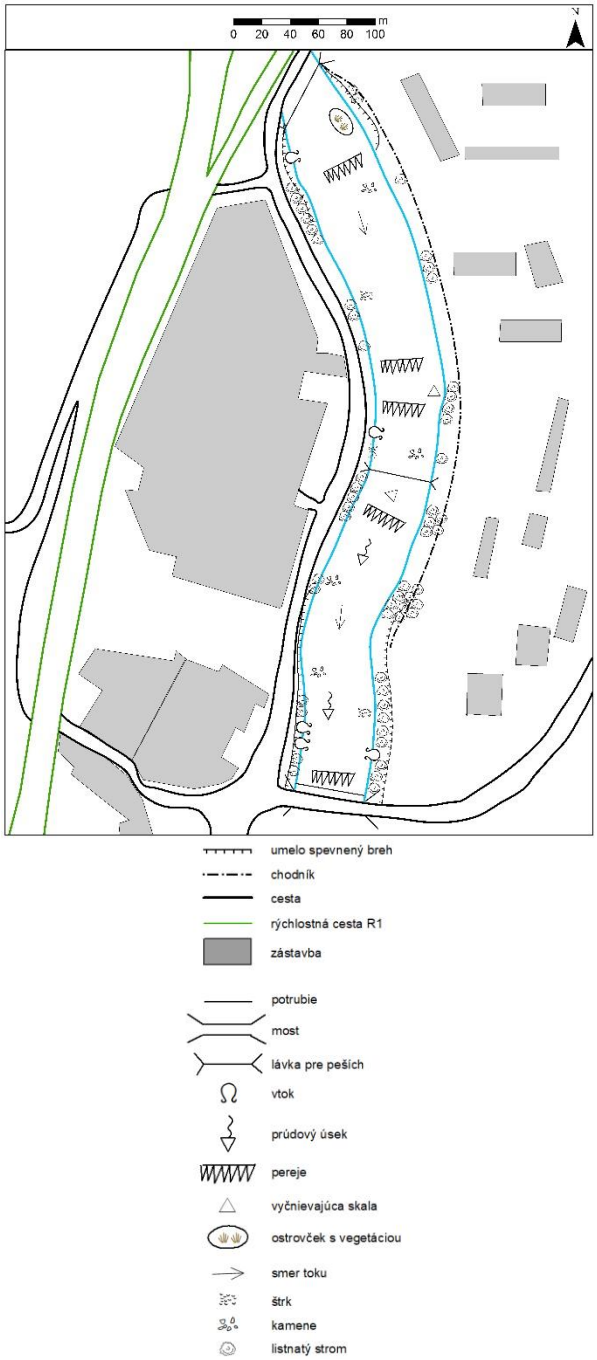
	Tajovský potok			Bystrica		
Mesiac	Horný tok	Stredný tok	Dolný tok	Horný tok	Stredný tok	Dolný tok
Máj	7	7	7	6	7	7
Jún	7	7	7	6	6	6
Júl	7	8	7	6	6	6
August	7	7	8	6	6	6
September	6	6	6	5	5	5
Október	6	6	6	5	5	5

Trentov biotický index	Kvalitatívne triedy čistoty vodného toku
9 - 10	veľmi dobrá
7 - 8	dobrá
5 - 6	stredná
2 - 4	na hranici únosnosti
0 - 1	zlá

Tab. 1 Hodnoty Trentovho biotického indexu na oboch vodných tokoch [dáta: autorka, zdroj: Pado, 2002]



Obr. 6 Koryto Tajovského potoka [zdroj: autorka, podkladová mapa: ZBGIS, Úrad geodézie, kartografie a katastra SR]



Obr. 7 Koryto Bystrice a jeho legenda [zdroj: autorka, podkladová mapa: ZBGIS, Úrad geodézie, kartografie a katastra]

Sprievodca obcou Uhrovec

A guide of the Uhrovec village

Ľuboš Sokol[1]
Školiteľ: Hilda Kramáreková[1]
[1]Katedra geografie, geoinformatiky a regionálneho rozvoja,
FPVaI UKF, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,
lubos.sokol@student.ukf.sk, hkramarekova@ukf.sk

Abstrakt

Cieľom článku bolo vytvoriť sprievodcu obcou Uhrovec, ktorý môžu využiť nielen návštevníci alebo aj samotní obyvatelia obce. Uhrovec si každý spája hlavne s hradom Uhrovec, s rodným domom Ľudovíta Štúra a Alexandra Dubčeka, s pamätníkom padlým v 2. svetovej vojne na Jankovom vŕšku alebo aj s Uhrovským múzeom. Budeme sa zaoberať charakteristikou obce – jej históriou, geografiou a zaujímavosťami. Súčasťou článku je aj charakteristika dvoch okruhov náučného chodníka.

Na vypracovanie tohto príspevku bola použitá metóda vysvetľujúceho opisu, metóda terénneho výskumu, kartografická metóda a systémová metóda.

Kľúčové slová: obec Uhrovec, Ľudovít Štúr, Alexander Dubček, hrad Uhrovec, Jankov vŕšok, Uhrovské múzeum, náučný chodník

Abstract

The aim of the article was to create a guide of Uhrovec village, which can be used ont only by visitors, but by residents of the village, too. The village of Uhrovec is associated mainly with the Uhrovec Castle, the Native House of Ľudovít Štúr and Alexander Dubček, with a monument to those who died in World War II on Jankov Hill or with the Museum of Uhrovec. We will deal with the characteristics of the village – its history, geography and with attractions. Description of the two lines of educational path is also part of the article.

During the preparation of this paper, we used explanatory description method, field research method, cartography method and system method.

Key words: village Uhrovec, Ľudovít Štúr, Alexander Dubček, Uhrovec Castle, Jankov Hill, Museum of Uhrovec, educational path

Úvod

Na Slovensku rastie záujem o lokálne informácie, rastie počet monografií, brožúr, letákov a pribúdajú aj náučné chodníky. Cestovný ruch je významnou spoločenskou hodnotou, ktorej význam spočíva vo vytváraní a formovaní príslušného kultúrneho prostredia. Dôležitú úlohu tu zohráva aplikácia princípov osvety a vzdelávania [14].

Cieľom článku je, na báze informácií o jej histórii a geografii, vytvorenie sprievodcu obcou Uhrovec, ktorá leží v okrese Bánovce nad Bebravou, v podobe návrhu dvoch okruhov náučného chodníka – okruhu po zaujímavostiach obce a okruhu turistického. Uhrovec má prírodný i kultúrno-historický potenciál pre rozvoj cestovného ruchu a náučný chodník je jedným zo spôsobov je rozvoja.

1 Teoreticko-metodické východiská problematiky

Základné informácie o obci Uhrovec, o jej polohe a vymedzení, sme čerpali z monografie obce dostupnej na webovej stránke obce [4] ako aj zo sekcie stránky s názvom Základné údaje [3]. Údaje o histórii obce sme získali tiež z webovej stránky obce zo sekcie História [2]. Charakteristiku symbolov obce a ich obrázky sme prevzali tiež z webovej stránky obce [5], ale tieto informácie sme doplnili údajmi z Heraldického registra Slovenskej republiky [10] a obrázkom pečate obce z knihy Uhrovec : 1258 - 2018 [9]. Vybrané informácie z geografie obce sme čerpali tiež z monografie obce [4].

Definíciu náučného chodníka sme prevzali z webovej stránky venovanej náučným chodníkom [1]. Ku charakteristike zastávok jednotlivých okruhov sme použili rôzne zdroje [15], [16], [12], [13].

Článok sme spracovali metódou vysvetľujúceho opisu. Viaceré údaje sme vizualizovali pomocou obrázkov, ktoré sme prevzali od iných autorov. Príspevok však obsahuje aj naše vlastné fotografie, získané terénnym výskumom. Na ilustráciu a lepšie pochopenie náučného chodníka sme samostatne kartografickou metódou vypracovali mapy. Článok sme systémovou metódou rozčlenili na kapitoly a podkapitoly.

2 Poloha a vymedzenie obce Uhrovec

Obec má nepravidelný tvar, pretiahnutý v smere východ-západ a má dve katastrálne územia - Uhrovec a Látkovce [4].

Uhrovec susedí so siedmimi obcami - na severe s obcami Žitná-Radiša a Uhrovské Podhradie, na východe, resp. na juhovýchode s obcou Dolné Vestenice, na juhu s obcami Hradište a Brezolupy a na západe s obcami Horné Naštice a Miezgovce[17].

Obec má rozlohu 22,94 km² a k 31.12.2023 v nej žilo 1 533 obyvateľov [18].

3 Vitajte v obci Uhrovec

V tejto kapitole si opíšeme základné informácie obce Uhrovec, ktoré boli nepostrádateľné pre náš výskum.

3.1 Z histórie obce

Hoci je Uhrovec z troch strán obkolesený zalesnenými Strážovskými vrchmi, aj napriek nepriaznivým terénnym a životným podmienkam bolo územie Uhrovskej doliny osídlené už v praveku. Najstaršia písomná zmienka o obci sa datuje do roku 1258, ale nemožno ju považovať za rok vzniku ani založenia obce. Od druhej polovice 16. storočia boli vlastníkmi celého uhrovského panstva príslušníci rodiny Zay, žijúcej na tomto území až do druhej svetovej vojny. Obyvatelia sa venovali predovšetkým poľnohospodárstvu, vyrábali víno a pestovali ovocie, bolo tu i niekoľko rybníkov. Počet remeselníkov sa postupne zvyšoval a vznikla tu súkenka. Neskôr tu bola vybudovaná známa sklárеň, ktorej výrobky boli celosvetovo známe. V druhej polovici 19. storočia bola založená továreň na výrobu drevených výrobkov, ktorá sa časom preorientovala na výrobu vychádzkových palíc. Pred prvou svetovou vojnou sa sklárеň presťahovala do Lednických Rovní a v Uhrovci zostal iba drevospracujúci priemysel. Uhrovec bol známy aj svojou odbojovou činnosťou počas druhej svetovej vojny. Pôsobila tu partizánska brigáda Jána Žižku pod vedením plk. Teodora Polu, ktorá mala podporu obyvateľstva celej doliny. Po druhej svetovej vojne sa tu ešte viac rozvinul drevársky priemysel - od paličkárne po dnešnú Drevovýrobu s.r.o., bývalá píla sa zmenila na závod Mier a neskôr na dnešný Avaks, s.r.o. Tieto zmeny si vyžiadali novú bytovú výstavbu, vybudovanie nových ulíc, novú technickú infraštruktúru, školské zariadenia, športoviská, miestnu komunikáciu i plynofikáciu [2].

Z Uhrovca pochádza, alebo tu pôsobilo, asi 20 literátov, národne uvedomelých učiteľov, ľudových dejateľov, výtvarníkov, spoločenskovedných a prírodovedných pracovníkov i politikov.

Najvýznamnejšou postavou je však Ľudovít Štúr, kodifikátor spisovnej slovenčiny, pedagóg, literát, novinár a politik, ktorý sa v Uhrovci narodil v roku 1815. Ďalším známym Slovákom, ktorý sa narodil v Uhrovci v roku 1921, bol Alexander Dubček, politik, najvýznamnejší predstaviteľ udalostí z roku 1968 [2].

Symboly obce Uhrovec sú tri. **Erb obce** tvorí v striebornom štíte zelený štylizovaný listnatý ružový ker s koreňmi a s piatimi červenými dvojitými zelenostredými a rovnakokališnými ružami na koncoch konárikov [5]. Rastlinný motív erbu je inšpirovaný podľa pečate obce z roku 1785 [10]. Vlajka obce pozostáva zo siedmych pozdĺžnych pruhov vo farbách červenej, bielej, červenej, bielej, červenej, bielej a zelenej. Pomer jej strán je 2:3 a ukončená je troma cípmi, t.j. dvoma zástrihmi, siahajúcimi do tretiny listu vlajky [5]. Pečať obce je kruhová, jej súčasťou je názov obce a erb.



Obr. 1 Erb obce Uhrovec
Zdroj: [5]



Obr. 2 Vlajka obce Uhrovec
Zdroj: [5]



Obr. 3 Pečať obce Uhrovec
Zdroj: [9]

3.2 Z geografie obce

V obci Uhrovec sa stretávajú dva základné tektonické celky - mezozoikum chočského príkrovu a terciérna výplň Bánovskej kotliny. Oba celky oddeľuje radišský zlom severojužného smeru, ktorý prebieha údolím toku Radiša a ďalej južne pokračuje západne od Ostrého vrchu. Celé územie je situované v južnej časti Nitrických vrchov, ktoré tvoria južný výbežok Strážovských vrchov. Zastúpené sú horskou skupinou Rokoš a jeho predhorím, ktoré južným a západným smerom klesá do Bánovskej pahorkatiny [4].

Geomorfologicky možno obec zaradiť na severe do podsústavy Karpaty, provincie Západné Karpaty, Fatranskotatranskej oblasti, celku Strážovské vrchy, podcelku Nitrické vrchy a časti Rokošské predhorie. Juhozápad územia je zaradený do podsústavy Panónska panva, subprovincia Malá Dunajská kotlina, oblasti Podunajská nížina, celku Podunajská pahorkatina, podcelku Nitrianska pahorkatina, časti Bánovská pahorkatina [4].

Z hľadiska klimatickogeografických typov patrí územie k typu kotlinovej – horskej klíme a subtypu – teplá klíma. Leto je dlhé, teplé a suché, prechodné obdobie veľmi krátke, s teplou až mierne teplou jarou a jeseňou. Počet letných dní v roku s teplotou 25 °C a viac je 50 - 60 dní. Zima je krátka, mierne teplá, suchá až veľmi suchá [4].

Hydrologicky patrí územie do povodia rieky Nitry. Kostru riečnej siete v severnej časti obce tvorí potok Radiša a v južnej časti obce potok Hydina. Oba potoky sa vlievajú do rieky Bebrava, Radiša v Bánovciach nad Bebravou a Hydina pri Ostraticiach. Bebrava je významným prítokom rieky Nitra. Radiša je zregulovaný potok a odvádza dažďové vody. Prítokmi Radiše v obci sú Zvernica, Jelešník, Brodový horný potok a Striebornica. Uhrovec má pitnú vodu vďaka skupinovému vodovodu, ktorý je zásobovaný vodným zdrojom Dobranská medzi Žitnou-Radišou a Uhrovským Podhradím [4].

Prevažnú časť výmery obce Uhrovec, až 68 %, tvorí lesná pôda (1 167,41 ha), poľnohospodárska pôda tvorí 25 % (607 ha), vodná plocha 1 % (11,73 ha), zastavaná plocha 1 % (5,47 ha) a ostatná plocha 1 % (19,01 ha) [4].

Vo východnej časti obce sa nachádza maloplošné chránené územie Prírodná rezervácia Jankov vŕšok. Územie bolo vyhlásené v roku 1993 na výmere 103,42 ha. Predmetom ochrany je ochrana vzácneho územia v južnej časti Strážovských vrchov – dubových lesov na vápencovo-dolomitovom podklade. Prevládajú tu riedke svetlé dubiny tvorené dubom plstnatým *(Quercus pubescens)* a dubom cerovým *(Quercus cerris).* Skupinovite sa tu vyskytuje borovica lesná (*Pinus silvestris*) [4].

V roku 1869, kedy bolo uskutočnené prvé oficiálne sčítanie ľudu, bývalo v Uhrovci 1 237 obyvateľov. Tento pomerne vysoký počet zapríčiňovala v tom čase prekvitajúca remeselná výroba, prichádzali sem ľudia zo širokého okolia. Neskôr, v roku 1871, tu bola založená továreň na výrobu obuvníckych kopýt, drevených klincov, hračiek a známych vychádzkových palíc. To znamenalo množstvo nových pracovných príležitostí a tak sa počet obyvateľov stále zvyšoval. V roku 1874 bola vybudovaná skláreň a práve táto zmena v obci mala za následok veľmi prudký nárast počtu jej obyvateľov. V priebehu cca 40 rokov, t.j. do roku 1910, stúpol počet obyvateľov až o 659 osôb na 1 896, čo bol súčasne aj najsilnejší zaznamenaný nárast počas celého sledovaného obdobia. A však v roku 1921 bolo už pri sčítaní ľudu napočítaných len 1 344 obyvateľov. Tento rapídny úbytok bol dôsledkom presťahovania sklárne ešte pred 1. svetovou vojnou do obce Lednické Rovne a teda následného odchodu robotníkov aj s rodinami za svojou prácou. V klesajúcom trende, i keď už v miernom, pokračoval vývoj aj počas vojnového obdobia až do sčítania ľudu v roku 1950, kedy dosiahol minimum 1 175 obyvateľov. Odzrkadlili sa tu napr. straty na životoch v boji a hospodárska kríza. Počas ďalších 11 rokoch vzrástol počet obyvateľov v obci o 234 osôb, budovali sa nové fabriky a tak opäť vznikali ďalšie pracovné príležitosti. Rast sa zastavil, podľa sčítania ľudu v roku 1970, na počte obyvateľov 1 575 a od tohto roku až po súčasnosť je zaznamenaný mierny pokles alebo stagnácia vo vývoji počtu obyvateľstva [16]. V roku 2023 žilo v obci celkovo 1 533 obyvateľov, pričom žien bolo 790 [17].

Dopravne je obec dobre prístupná, najmä v hlavnom západo-východnom smere (E-572) cez okresné mesto Bánovce nad Bebravou. Uvedená medzinárodná komunikácia je od obce vzdialená len 7,5 km po miestnej ceste III. triedy cez obec Horné Naštice. Letecké spojenie okres nemá. Táto oblasť je špecifická aj tým, že v jej blízkosti cca 30 km západne prechádza diaľnica D1 a zároveň je tu aj cesta, ktorá spája Považie a Záhorie s regiónom Horná Nitra. Je to jediná kvalitná cesta ďalej v smere na Banskú Bystricu [19].

Hromadná preprava osôb je v súčasnosti v Uhrovci zabezpečovaná Slovenskou autobusovou dopravou, a.s.. Obyvatelia majú možnosť využiť dopravné služby autobusovými prímestskými linkami smerom na mesto Bánovce nad Bebravou - denne celkovo cca 35-krát v pracovných dňoch, cca 14-krát počas sobôt a v nedeľu a sviatky celkovo 12-krát. Bez prestupu majú možnosť využiť obyvatelia priamu linku do mesta Bánovce 31-krát. Prvý autobus odchádza z obce v pracovných dňoch o 4:40 hodine a posledný o 21:20 hodine. Cez víkend odchádza prvý autobus z obce o 4:40 hodine a posledný o 17:30 hodine. Uvedenú frekvenciu autobusového spojenia možno považovať vzhľadom na veľkosť obce za primeranú [19].

3.3 Náučný chodník obcou

Náučné chodníky reprezentujú vzdelávacie trasy, často zamerané na turistiku, ktoré prechádzajú prírodnými alebo kultúrne významnými miestami alebo typickými lokalitami daného regiónu. Tieto trasy sú obvykle jasne označené v teréne aj na mapách. Na týchto chodníkoch, alebo v ich okolí, sú umiestnené významné či zaujímavé objekty alebo javy, ktoré sú detailne vysvetlené prostredníctvom informačných panelov. Pri tvorbe náučných chodníkov tvorcovia vyberajú z prírody a kultúry objekty alebo javy, ktoré majú význam z

hľadiska prírodovedy, histórie, kultúry, techniky alebo iných pozoruhodných aspektov. Tieto objekty a javy sú následne podrobne popísané na informačných paneloch, pričom texty sú doplnené fotografiami, mapami, plánmi alebo nákresmi, aby boli informácie ľahko prístupné a zrozumiteľné. Základným cieľom náučných chodníkov je povzbudiť návštevníka k porovnaniu teoretických poznatkov, ktoré získal zo správ, sprievodcov alebo letákov, s realitou krajiny, ktorú práve spoznáva a pozoruje. Ide o konfrontáciu medzi teóriou a skutočnosťou prostredníctvom priamej skúsenosti a pozorovania okolia [1].

3.3.1 Okruh zaujímavosťami obce Uhrovec

Obec Uhrovec leží severovýchodne od Bánoviec nad Bebravou, na nive rieky Radiša zahĺbenej v okraji Nitrianskej pahorkatiny, na jej kontakte so Strážovskými vrchmi, pod ústím potoka Striebornica.

Pri návšteve obce je najprv vhodné sa oboznámiť so zaujímavosťami v jej intraviláne (mapa 1).

Mapa 1: Okruh zaujímavosťami obce Uhrovec



Zdroj: Sokol, 2024

Keď turista príde do obce Uhrovec autobusovou dopravou, vystúpi na zastávke na námestí, kde sa nachádza prvá zastávka okruhu po obci Uhrovec a to je miestne **kultúrne stredisko a obecná knižnica**. Kultúrne stredisko organizuje v spolupráci s ostatnými kultúrnymi inštitúciami, miestnymi organizáciami, základnou školou s materskou školou a Obcou Uhrovec všetky formy kultúrnej činnosti, kde dosahuje vynikajúce výsledky. Tieto aktivity sú spracované v pláne kultúrnych a športových aktivít. Z organizácií sa na tejto činnosti podieľajú najmä hasiči, miestna telovýchovná jednota, kolkári, stolnotenisti, kynológovia, turisti, únia žien, Poľovnícke združenie Ľudovíta Štúra a ľudová knižnica. Tradície predkov dnes žijú v piesňach a tancoch mladej, strednej i staršej generácie - o ich zachovanie a prezentáciu sa stará Folklórna skupina Uhrovčan [15].

Ľudová knižnica v Uhrovci v súčasnosti disponuje s knižným fondom necelých 9 000 zväzkov s voľným výberom literatúry. Knižnica bola dlhodobo hodnotená ako jedna z najlepších v rámci Slovenska, o čom svedčí i jej niekoľkokrát udelený titul Vzorná ľudová knižnica udelený Ministerstvom kultúry SR. Knižnica spolupracuje pri organizovaní krajských súťaží Štúrov a Dubčekov rétorický Uhrovec a súťaže v umeleckom prednese poézie a prózy Štúrov Uhrovec [16].

Druhú zastávku predstavuje **Uhrovské múzeum** (obr. 4), lokálne múzeum v centre Uhrovca. Vo svojich siedmich expozíciách prezentuje osobnosti a históriu obce, miestne ľudové tradície, odevy, kroje, ručné práce pracovné náradie. Návšteva múzea je možná iba po predchádzajúcej dohode [1].



Obr. 4 Uhrovské múzeum
Zdroj: [7]

Ďalšou - treťou - zastávkou je **evanjelický kostol** postavený v roku 1940 podľa projektu významného slovenského architekta Michala Milana Harminca. Na hladkých fasádach kostola sú vysoké polkruhovo zakončené okná a veža je zastrešená ihlanom. Oltár je zdobený neskorobarokovým obrazom Posledná večera z konca 18. storočia [12].

Štvrtou zastávkou je **Rodný dom Ľudovíta Štúra a Alexandra Dubčeka** (obr. 5). Ľudová stavba v centre Uhrovca z obdobia 18. storočia je expozíciou Trenčianskeho múzea v Trenčíne venovanou ich životu a dielu. Jednopodlažný dom na obdĺžnikovom pôdoryse s hladkou bielenou fasádou a šindľovou strechou bol pôvodne školou s učiteľským bytom, neskôr slúžil aj ako stolárska dielňa. Na dome sú osadené pamätné tabule oboch dejateľov. Od roku 1965 je objekt národnou kultúrnou pamiatkou. Múzeum je otvorené celoročne [1].



Obr. 5 Rodný dom Ľ. Štúra a A. Dubčeka
Zdroj: [6]

Piatou zastávkou je **rímsko-katolícky Kostol Ducha Svätého**, postavený v roku 1817. Hlavný oltár kostola je klasicistický s plochou pilastrovou architektúrou, zakončenou segmentovým štítom a s obrazom Zoslania Ducha svätého. Nad vchodom do krypty je zamurovaný renesančný epitaf z predošlého kostola [13].

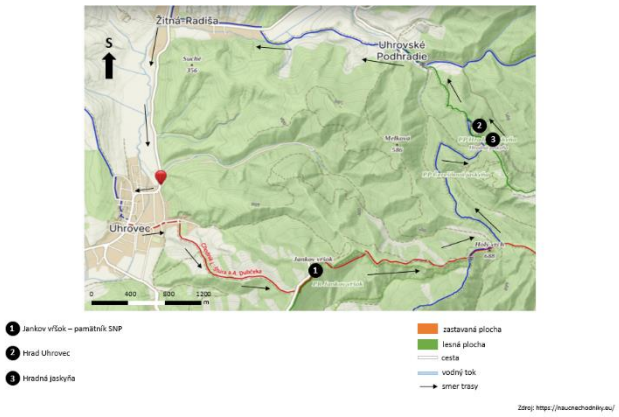
Poslednou - šiestou - zastávkou je renesančný **Uhrovský kaštieľ** rodiny Zayovcov, ktorý sa nachádza na vyvýšenine nad obcou Uhrovec. S neskoro renesančnou prestavbou staršej kúrie sa začalo v roku 1613. V súčasnosti kaštieľ predstavuje dvojpodlažnú dvojkrídlovú stavbu so stredným nádvorím a nepravidelným pôdorysom. V roku 1767 prešiel barokovou úpravou, no aj napriek tomu si zachoval svoj renesančný charakter. Neskôr bol kaštieľ upravený romanticky. Hoci v roku 1977 bola uskutočnená jeho pamiatková obnova, v súčasnosti nie je využívaný a chátra. Kaštieľ preto nie je prístupný verejnosti, ale v jeho okolí sa nachádza prírodno-krajinársky park, ktorý stojí za návštevu. Kaštieľ je spolu s parkom zapísaný ako kultúrna pamiatka v Ústrednom zozname pamiatkového fondu SR [11].

3.3.2 Turistický okruh cez Jankov vŕšok a hrad Uhrovec

Začiatok tejto trasy (mapa 2) je v obci, na Námestí Ľ. Štúra.

Po chodníku Ľ. Štúra a A. Dubčeka smerom na východ od centra obce sa dostaneme k **Pamätníku SNP na Jankovom vŕšku** (obr. 6). Je to mohyla na vrchole vŕšku s 15 metrov vysokým pylónom a mauzóleom. Je venovaný partizánom štyroch národností, ktorí tu zahynuli počas druhej svetovej vojny. Pri pamätníku sa nachádza prírodný amfiteáter, ktorý slúži na oslavy SNP. Mimo tohto areálu sú sprístupnené viaceré historické partizánske bunkre. Komunikácia vedúca z obce k pamätníku je využívaná motoristickými a cyklistickými pretekmi do vrchu [1].

Mapa 2: Turistický okruh cez Jankov vŕšok a hrad Uhrovec



Zdroj: Sokol, 2024



Obr. 6 Pamätník SNP na Jankovom vŕšku
Zdroj: [8]

V bezprostrednej blízkosti pamätníka sa nachádza **Prírodná rezervácia Jankov vŕšok.** Za chránené územie bolo vyhlásené v roku 1993 z dôvodu ochrany vzácneho územia dubových lesov na vápencovo-dolomitovom podklade [1].

Ďalšou zastávkou je **hrad Uhrovec** (obr. 7), už na území obce Uhrovské Podhradie. Je to zrúcanina stredovekého románsko-gotického hradu budovaného v 13. – 17. storočí, jedného z najzachovanejších na Slovensku. Na strmom skalnatom vrcholku Strážovských vrchov, vysokom takmer 600 m n. m., na konci dlhej rázsochy vybiehajúcej k západu z masívu Veľký Čihoč, ho vybudoval pravdepodobne v období 1251 – 1293 Báš z rodu Hunt-Poznanovcov ako hradbu s pôdorysom trojuholníka s troma nárožnými vežami. Z tejto neskororománskej stavby sa dochovala na Slovensku jedinečná románska hradná kaplnka s polkruhovou apsidou. V roku 1285 sa hradu zmocnil Matúš Čák, v roku 1389 ho ako kráľovský majetok Žigmund Luxemburský daroval Stiborovi zo Stiboríc.

V 15. – 16. storočí sa jeho majitelia striedali (Pongrácovci, Peter Szilágyi), až ho v roku 1547 cisár daroval Zayovcom, ktorí ho po renesančnej úprave udržiavali a čiastočne využívali do začiatku 19. storočia. Hrad nebol zničený ani za tureckých nájazdov, pustnúť začal až po vypálení v júli 1848. Vďaka tomu, napriek jeho stavu ruiny, je zachovaných výnimočne mnoho prvkov rôznych stavebných období, napr. profilované okná, portály, klenby, bašty, povrchy a omietky múrov budov. Od roku 2000 prebieha sanácia a konzervácia zrúcanín hradu, ktorý je národnou kultúrnou pamiatkou, v posledných rokoch zásluhou občianskeho združenia Hrad Uhrovec. Hrad je verejnosti voľne prístupný, vďaka svojej polohe poskytuje výnimočné výhľady [1].



Obr. 7: Hrad Uhrovec
Zdroj: Sokol, 2022

Poslednú zastávku neďaleko hradu Uhrovec predstavuje **Hradná jaskyňa** (obr. 8). Je to korózno-rútivá jaskyňa dlhá 11 m na zalesnenom horskom chrbte asi 100 m juhovýchodne od hradu. Verejnosti je voľne prístupná [1].



Obr. 8 Hradná jaskyňa
Zdroj: Sokol, 2023

3.4 Súčasnosť obce Uhrovec

V súčasnosti je obec Uhrovec členom mikroregiónu Uhrovská dolina (obr. 9). Hlavnými cieľmi mikroregiónu sú spoločná ochrana zákonných práv a záujmov obcí, rozvoj efektívnej samosprávy obcí, iniciovanie a podpora demokratických, politických a spoločenských procesov v mikroregióne, hospodársko-ekonomické aktivity, aktivity v oblasti ochrany a tvorby životného prostredia a výchovy občanov v tomto smere, rozvoj starostlivosti o zdravie obyvateľov, rozvoj humanitnej a sociálnej starostlivosti, ochrana a rozvoj historických tradícií, športovo-turistické aktivity, rôzne programy pre manažment obcí i obyvateľov [20].



Obr. 9: Informačná tabula Mikroregiónu Uhrovská dolina
Zdroj: Sokol, 2022

Čo sa týka projektov a aktivít obce Uhrovec, prioritou je obnova strechy kaštieľa, vybudovanie tradičnej ovocnej záhrady pri dome kultúry v Uhrovci, realizácia Wifi pre obec, modernizácia vybavenia odborných učební v ZŠ s MŠ Uhrovec, 3D prezentácia kultúrnych pamiatok, pamätihodností a atraktivít podporujúcich rozvoj cestovného ruchu a pod. [21].

Záver

Cieľom práce bolo predstaviť čitateľovi, obyvateľom obce i jej návštevníkom najpodstatnejšie informácie o obci návrhom dvoch poznávacích okruhov po obci Uhrovec a jej okolí. Na chuť si prídu milovníci pamiatok a histórie, ale aj prírody, turistiky a krásnych výhľadov. Návštevníci pritom majú na výber z dvoch alternatív podľa svojich preferencií.

Pre milovníkov histórie bude najatraktívnejšou atrakciou a pamiatkou rodný dom Ľudovíta Štúra a Alexandra Dubčeka. Nachádzajú sa tu taktiež dva kostoly – evanjelický a katolícky. Múzeum v obci približuje najmä každodenný život niekdajšieho obyvateľstva. Historicky je významný aj Zayovský

kaštieľ, ktorý sa radí medzi kultúrne pamiatky. Neďaleko obce Uhrovec možno nájsť ďalšie zaujímavé turistické atrakcie, ako napríklad Pamätník SNP na Jankovom vŕšku a zrúcaninu hradu Uhrovec.

Bolo by ale zaujímavé dva navrhnuté okruhy obcou a jej zázemím prepojiť s náučným chodníkom Striebornica. Tento vznikol v obci v roku 2013, jeho informačné tabule sú z roku 2019, avšak informácia o ňom v teréne chýba. Je tabule by bolo vhodné zakomponovať najmä do okruhu zaujímavostí intravilánu obce.

Z príspevku je tak, podľa nášho názoru zrejmé, že obec Uhrovec so svojím okolím disponuje okrem rodného domu dvoch velikánov, o ktorých sa deti učia už na základných školách, aj inými zaujímavými miestami, ktoré stoja za návštevu. Oba navrhnuté okruhy tak majú aj vysoký edukačný potenciál, ktorý by si zaslúžil intenzívnu propagáciu.

Poďakovanie

Za podporu pri vzniku tohto článku ďakujem mojej školiteľke RNDr. Hilde Kramárekovej, PhD.

Použitá literatúra

[1] Náučné chodníky na Slovensku. [online]. [cit. 6.3.2024]. Dostupné z: https://naucnechodniky.eu/ [2] História obce Uhrovec. [online]. [cit. 5.3.2024]. Dostupné z: https://www.uhrovec.sk/historia.html

[3] Základné údaje. [online]. [cit. 5.3.2024]. Dostupné z: https://www.uhrovec.sk/zakladne-udaje.html

[4] Monografia obce Uhrovec. [online]. [cit. 5.3.2024]. Dostupné z: https://www.uhrovec.sk/monografia-obce-uhrovec.html

[5] Symboly obce. [online]. [cit. 5.3.2024]. Dostupné z: https://www.uhrovec.sk/symboly-obce.html

[6] Rodný dom Ľ. Štúra a A. Dubčeka v Uhrovci. [online]. [cit. 5.3.2024]. Dostupné z: https://www.kamnavylet.sk/sk/atrakcia/rodny-dom-l-stura-a-a-dubceka-v-uhrovci

[7] Uhrovské múzeum. [online]. [cit. 5.3.2024]. Dostupné z: https://uhrovskadolina.webnode.sk/co-vidiet-a-zazit/uhrovske-muzeum/

[8] Jankov vŕšok – Pamätník SNP [online]. [cit. 5.3.2024]. Dostupné z: https://www.trencinregion.sk/89356/pamatnik-snp-na-jankovom-vrsku

[9] Máčeková Z., Beštová E., Váňová S. a kol. (2017). Uhrovec : 1258 - 2018. FOMI s. r. o., Vrútky. 119 s. ISBN 978-80-971832-4-0.

[10] Heraldický register Slovenskej republiky. [online]. [cit. 6.3.2024]. Dostupné z: https://ives.minv.sk/heraldreg/detail?id_nositel=936

[11] Zayovský kaštieľ v Uhrovci. [online]. [cit. 6.3.2024]. Dostupné z: https://blog.relaxos.sk/zayovsky-kastiel-v-uhrovci/

[12] Uhrovec – Evanjelický kostol. [online]. [cit. 6.3.2024]. Dostupné z: https://www.pamiatkynaslovensku.sk/uhrovec-evanjelicky-kostol

[13] Uhrovec – Kostol Zoslania Ducha svätého. [online]. [cit. 6.3.2024]. Dostupné z: https://www.pamiatkynaslovensku.sk/uhrovec-kostol-zoslania-ducha-svateho

[14] Orban E. (2022). Aktuálne problémy cestovného ruchu na Slovensku. In *Ekonomika cestovného ruchu a podnikanie*. ISSN 1337-9313, vol. 14, no. 1(40), p. 53-63

[15] O miestnom kultúrnom stredisku. [online]. [cit. 6.3.2024]. Dostupné z: https://www.uhrovec.sk/o-miestnom-kulturnom-stredisku.html

[16] Ľudová knižnica. [online]. [cit. 6.3.2024]. Dostupné z: https://www.uhrovec.sk/o-miestnom-kulturnom-stredisku.html

[17] ZBGIS. [online]. [cit. 7.3.2024]. Dostupné z: https://zbgis.skgeodesy.sk/mkzbgis/sk/zakladna-mapa?pos=48.800000,19.530000,8

[18] DataCube. [online]. [cit. 7.3.2024]. Dostupné z: https://datacube.statistics.sk/

[19] Program hospodárskeho a sociálneho rozvoja obce Uhrovec [online]. [cit. 3.4.2024]. Dostupné z: https://www.uhrovec.sk/phsr.html

[20] Mikroregión Uhrovská dolina [online]. [cit. 26.4.2024]. Dostupné z: https://www.uhrovec.sk/mikroregion-uhrovska-dolina.html

[21] Projekty obce Uhrovec [online]. [cit. 3.4.2024]. Dostupné z: https://www.uhrovec.sk/projekty/mid/515524/ma0/all/.html#m_515524

Hodnotenie cykloturistickej siete v regióne Turiec

Evaluation of cycling network in Turiec region

Tomáš Šuvada[1]
Školiteľ: Michaela Žoncová
[1]Katedra geografie a geológie, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica
tsuvada@student.umb.sk, michaela.zoncova@umb.sk

Abstrakt

Turiec je jedným z tradičných regiónov Slovenska. Nielen prírodné bohatstvo, ale taktiež aj kultúrno-historický a etnografický odkaz umožňuje vznik regiónu cestovného ruchu s veľkou variabilitou ponúkaných možností trávenia voľného času. Jednou z ponúkaných možností je využívanie existujúcej cykloturistickej siete, ktorá pokrýva veľkú časť regiónu, prepája väčšinu obcí a ponúka možnosti návštevy okolitých pohorí a podhorských oblastí.

Cieľom príspevku je hodnotenie siete cyklotrás v regióne pomocou vybraného metodického postupu tvorby indexu "bicyklovateľnosti", pričom vďaka vytvoreným mapovým výstupom poukážeme na vhodné, aj menej vhodné lokality, ale taktiež aj na lokality, kde by sa dali v budúcnosti vytvoriť nové cyklotrasy. V rámci článku navrhujeme na základe dosiahnutých výsledkov praktické návrhy nových trás, ktoré by teoreticky mohli byť v budúcnosti vyznačené ako oficiálne cyklotrasy.

Kľúčové slová: cykloturizmus, cyklotrasa, cykloturistická sieť, Turiec

Abstract

Turiec is one of the traditional regions of Slovakia. Not only natural heritage, but also historic-cultural and etnographic legacy allows to create region of tourism with wide variability of available choices. One of available choices is the use of existing cycling network, which covers the large part of region, connects majority of municipalities and allows visiting surrounding mountains and foothill areas.

Objective of the article is to evaluate the network of cycle paths in the region, using a selected methodical procedure for creating the "bikeability" index, while thanks to the created map outputs we will point out suitable and less suitable locations, but also locations where new cycle paths could be created in the future. In the article, based on the achieved results, we propose practical submissions for new routes, which could theoretically be marked as official cycle paths in the future.

Key Words: cycle tourism, cycle path, cycling network, Turiec

Úvod

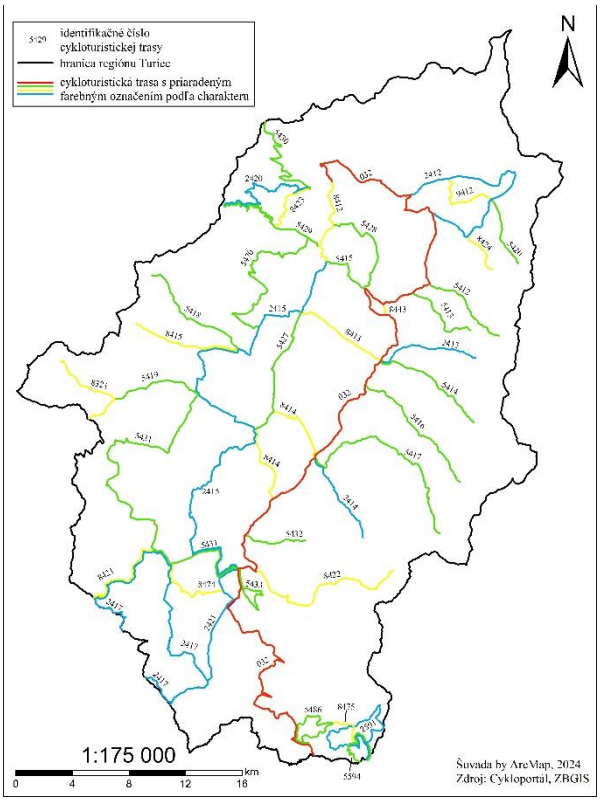
Cykloturizmus sa v posledných dvoch desaťročiach stal populárnou a atraktívnou voľnočasovou aktivitou. Ide o formu cestovného ruchu, ktorá sa rýchlo rozvíja a jej vývoj je ovplyvnený postupnou zmenou životného štýlu určitej časti populácie, ktorej pracovné návyky sú spojené so sedavým druhom zamestnania. Protiváhou k často stresujúcej a časovo náročnej náplni práce je pohyb v čase osobného voľna. Ten je možné využiť mnohými spôsobmi, a práve cykloturistika je jedným zo spôsobov, ktoré v posledných desaťročiach nadobudli veľkú popularitu [1]. Zvyšujúci sa záujem o túto formu turizmu viedol k rozvoju aj v iných oblastiach, ako je napríklad priemysel (ľahšie, odolnejšie a kvalitnejšie bicykle, komponenty a príslušenstvo) a cestovný ruch (budovanie cyklotrás, vznik dedikovanej drobnej infraštruktúry a podobne). Práve vznik cykloturistickej infraštruktúry v rámci jednotlivých regiónov a oblastí vedie ku otázke, čo by bolo možné zlepšiť a akým smerom by sa mal uberať rozvoj, a práve Turiec je jedným z regiónov s pomerne hustou sieťou cyklistických trás (mapa 1), ktoré nezasahujú len do kotlinových oblastí, ale taktiež aj do okolitých pohorí.

Cykloturistické trasy sú v správe Turčianskej bicyklovej skupiny JUS. Okrem tejto skupiny pôsobí od roku 2018 v regióne aj OZ Turiec Trails, ktoré pôsobí nezávisle od Turčianskej bicyklovej skupiny JUS a zameriava sa na výstavbu a udržiavanie trailov v Lúčanskej Malej Fatre, konkrétne v oblastí Martinských holí. Realizovanie výstavby nových cyklotrás a drobného cyklistickej infraštruktúry je zabezpečované s pomocou finančných prostriedkov Ministerstva dopravy a výstavby Slovenskej republiky, Žilinského samosprávneho kraja, z eurofondov vo forme projektov Integrovaného regionálneho operačného programu [2] alebo Fondu malých projektov [3]. Samotné samosprávne obce sa

k budovaniu a zveľaďovaniu cyklotrás stavajú odlišne, v rámci aktivít realizovaných v rámci Programu hospodárskeho a sociálneho rozvoja obce [4] je vidieť, koľko bolo investovaných zdrojov do tohto odvetvia cestovného ruchu a zároveň je zjavné, že obce majú snahu o zlepšenie častokrát nedostatočného pokrytia cyklotrasami.

Podľa farebného označenia rozlišujeme 4 typy cykloturistických trás, a to trasy označené červenou farbou (magistrály vedúce najzaujímavejšími, resp. najdôležitejšími oblasťami regiónu), modrou farbou (paralelné s magistrálami alebo náročnejšie a dlhšie trasy mimo magistrál), zelenou farbou (rodinné, nenáročné a stredne náročné trasy) a žltou farbou (spojovacie trasy medzi významnejšími trasami, prípadne odbočky k významnejším prírodným alebo kultúrno-historickým zaujímavostiam regiónu).

V rámci budovania cykloturistických trás a pridruženej infraštruktúry je možné v posledných rokoch pozorovať rýchly rozvoj náročnejších foriem horskej cyklistiky, označovanej aj ako MTB cyklistiky (z anglického mountain biking), na ktorých praktizovanie je nutné mať pokročilé zručnosti v jazdení na bicykli v náročnejších podmienkach, kde sa zvyšuje riziko pádu a prípadného zranenia. Tieto formy MTB cyklistiky využívajú vo veľkej miere traily, resp. singletracky, čo sú relatívne úzke, technicky náročné trasy s upraveným prírodným povrchom a s prítomnými prírodnými, resp. čiastočne upravenými prekážkami v podobe skál, koreňov stromov alebo iných výrazných prvkov v krajine, alebo umelo vytvorenými prekážkami v podobe skokov, klopených zákrut alebo iných technicky náročných prvkov zvyšujúcimi atraktivitu u horských cyklistov. Najviditeľnejším rozdielom medzi trailom a cykloturistickou trasou je ten, že budovanie trailu nie je obmedzované technickými predpismi a normami ako v prípade budovania cyklotrás (kde je nutné dodržať schválené parametre ako je napríklad maximálne možné prevýšenie na určitom úseku, polomer zákruty pri určitej rýchlosti vedenia bicykla, možnosti križovania cestných komunikácií a podobne) a je možné ho vybudovať teoreticky kdekoľvek v prírode, pričom zjazdnosť a bezpečnosť samotného trailu je limitovaná fyzickými a technickými schopnosťami každého cyklistu. Ďalším rozdielom je aj to, že väčšina trailov, resp. singletrackov je jednosmerná s odporúčaným, resp. prikázaným smerom jazdy, kým prevažná väčšina cykloturistických trás má povolené obojsmerné vedenie premávky.



mapa 1: Oficiálne značená cykloturistická sieť v Turci
zdroj: [6]

Oficiálne značené trasy ponúkajú mnoho možností, no často cykloturisti zameraní na horskú cyklistiku vyhľadávajú miesta, ktoré nie sú prístupné po oficiálne značených trasách a sú nútení využívať sieť komunikácií často pozostávajúcich z lesných alebo poľných ciest, zvážnic a prístupových trás určených pre lesné hospodárstvo a poľnohospodárstvo, prípadne využívajú sieť turistických chodníkov pre pešiu turistiku. Motiváciou pre takéto správanie môže byť práve nedostatok cyklistických trás, ktoré by spĺňali požiadavky a predstavy náročnejších alebo skúsenejších cyklistov, predovšetkým v rámci sféry horskej cyklistiky.

1 Metodika

V tomto príspevku sa zameriame na hodnotenie regiónu Turiec podľa vybraných priestorových indikátorov, pričom výstupom práce v prostredí GIS (program ArcMap, verzia 10.2) je index bicyklovateľnosti“ územia, ktorý zobrazuje vhodnosť vybraného územia pre prítomnosť cyklotrás a drobnej cyklistickej infraštruktúry na základe vybraných indikátorov, ktoré vplývajú na výber trasy cyklistami. Použitá metodika je inšpirovaná článkom *Development*

of a Bikeability Index to Assess the Bicycle-Friendliness of Urban Environments (Krenn, Oja, Titze, 2015) [5]. Nami vybrané indikátory pre vytvorenie daného indexu sú sklonitosť svahov (spätá s fyzickou náročnosťou trasy), krajinná pokrývka (prítomnosť zelených a vodných plôch ako sú lesy, lúky, polia, vodné nádrže a podobné areály zvyšujú atraktivitu vybranej lokality), cestná sieť Slovenskej republiky (nakoľko cesty 1., 2. a 3. triedy sú obmedzujúcim faktorom pre cyklotrasy a bezpečnosť na nich, kedy dochádza k riziku ohrozenia života a zdravia účastníkov dopravy) a už existujúce cyklotrasy v rámci regiónu (oficiálne značené cyklotrasy s priradeným identifikačným číslom a priradenou farbou podľa náročnosti a charakteru trasy).

Základom pre prácu na tomto príspevku je ohraničenie tradičného regiónu Turiec. Hranicu regiónu predstavujú administratívne hranice okresov Martin a Turčianske Teplice s okolitými okresmi. V rámci vytýčeného záujmového územia sme pomocou portálu www.cykloportal.sk [6] vytvorili vrstvy jednotlivých oficiálne značených cyklotrás (s priradeným číslom a identifikačnou farbou) pomocou dostupných GPX súborov, ktoré sme v prostredí GIS prekonvertovali na bodové a neskôr na líniové vrstvy, z ktorých sme vytvorili jednu vrstvu cyklotrás (pomocou funkcie Merge) s ktorou sme ďalej pracovali. Ďalším krokom bolo vytvorenie štvorcovej siete, respektíve gridu (vytvorenie cez funkciu Create Fishnet) s veľkosťou bunky 250x250 m a s ohraničením na hranice regiónu. Následne sme vytvárali vrstvy parciálnych hodnotiacich indikátorov. Vrstvu krajinnej pokrývky sme vytvorili orezaním voľne dostupnej vrstvy Corine Land Cover (stav z roku 2018) [7] podľa hraníc regiónu (funkciou Clip), polygónovú vrstvu sklonitosti svahov sme vytvárali z Digitálneho modelu reliéfu [8] s rozlíšením 5x5m pomocou série funkcií (Extract by Mask – Slope – Int – Raster to Polygon). Vrstvu cestnej siete v regióne sme vytvorili pomocou máp v mierke 1:50 000 dostupných na stránke správy ciest [9] [10], pričom sme obrázky zgeoreferencovali (pomocou funkcie Georeferencing), vytvorili sme novú líniovú vrstvu a manuálne sme vyklikali línie ciest 1., 2. a 3. triedy do danej vrstvy.

Ďalším krokom bolo rozdelenie dát parciálnych indikátorov do štvorcovej siete (gridu). To sme docielili použitím funkcie Intersect pri dvojiciach vrstiev (grid – sklon; grid – krajinná pokrývka; grid – cestná sieť; grid - cyklotrasy), pričom vznikli 4 nové samostatné vrstvy. Následne sme pomocou funkcie Summary Statistics (zo sekcie Analysis Tools – Statistics v ArcToolBoxe) vytvorili tabuľky údajov pre jednotlivé štvorce v gride. Tabuľka sklonu obsahovala priemernú hodnotu sklonu bunky v stupňoch (pomocou funkcie MEAN), tabuľka krajinnej pokrývky obsahovala percentuálny podiel zelených a vodných plôch v rámci štvorca (pomocou funkcie SUM sa získala celková rozloha (AREA) zelených plôch v rámci štvorca a následne sa výpočtom ("AREA"/62500*100) určil ich percentuálny podiel), tabuľka cestnej siete obsahovala celkovú dĺžku ciest v rámci štvorca (pomocou funkcie SUM) a tabuľka cyklotrás obsahovala údaj o celkovej dĺžke cyklotrás v rámci štvorca (pomocou funkcie SUM). Vytvorené tabuľky sme pripojili do vrstvy štvorcovej siete (cez možnosť Joins and Relates) a vznikla nám vrstva s veľkou atribútovou tabuľkou, ktorá obsahovala údaje o vybraných indikátoroch v rámci každého štvorca danej siete.

Ďalej sme vytvárali rastrové vrstvy pre vybrané indikátory (pomocou Polygon to Raster). Novovzniknuté 4 rastrové vrstvy sme reklasifikovali do 10 intervalov (vrstva sklonu bola reklasifikovaná manuálne a ostatné 3 vrstvy boli reklasifikované pomocou možnosti Natural), pričom každý interval dostal bodové hodnotenie na škále 1-10 (tabuľka 1) (čím vyššia bodová hodnota, tým pozitívnejší charakter indikátora v rámci štvorca).

Tabuľka 1: Bodové hodnoty spracovaných indikátorov

bodová hodnota	cyklotrasy (m)	cesty (m)	zelené plochy a vodné plochy (%)	priemerný sklon (°)
1	0-27	773,3-497,1	0-8	25,1-46,7
2	27,1-81	497-374,1	8,1-22	17,1-25
3	81,1-134	374-304,1	22,1-35	13,1-17
4	134,1-185	304-268,1	35,1-48	11,1-13
5	185,1-236	268-227,1	48,1-60	9,1-11
6	236,1-288	227-177,1	60,1-71	7,1-9
7	288,1-367	177-129,1	71,1-81	5,1-7
8	367,1-484	129-79,1	81,1-90	3,1-5
9	484,1-701	79-26,1	90,6-96	1,5-3

10	701,1-1118	26-0	96,1-100	0-1,5

Reklasifikované vrstvy sme vložili do funkcie Weighted Overlay (Spatial Analyst Tools – Overlay v ArcToolBoxe), priradili im dôležitosť (cyklotrasy 30%, sklon 30%, cestná sieť 20% a krajinná pokrývka 20%). Výsledkom je rastrová vrstva reklasifikovaná do desiatich tried (1-10, pričom 1 predstavuje lokality nevhodné a 10 lokality vhodné pre prítomnosť cyklotrás a pridruženej infraštruktúry).

Ďalším výstupom je alternatívny index "bicyklovateľnosti", pri ktorom sú hodnotenými indikátormi iba sklon, krajinná pokrývka a cestná sieť. Postup tvorby výstupu je obdobný ako pri predchádzajúcom indexe, vo finálnej funkcii (Weighted Overlay) však absentuje použitie rastra cyklotrás. Po priradení dôležitosti jednotlivých indikátorov (sklon – 40%, krajinná pokrývka 30% a cestná sieť 30%) vznikne alternatívny výstup, ktorý zobrazuje vhodnosť jednotlivých lokalít pre cyklotrasy a pridruženú infraštruktúru, pričom neberie do úvahy už existujúcu sieť cyklotrás a zobrazuje teda lokality teoreticky vhodné na budovanie cyklotrás a infraštruktúry. Výsledné výstupy je možné porovnať, určiť vhodnosť už existujúcich trás a navrhnúť prípadné nové cyklotrasy a ich vedenie na základe dodatočného terénneho prieskumu.

Na základe alternatívneho indexu "bicyklovateľnosti" vytvoríme návrhy nových cyklotrás, ktoré by mali potenciál na vyznačenie a celkové zoficiálnenie. Návrhy sú tvorené na základe vlastnej skúsenosti autora a konzultácie s OZ Turiec Trails, ktoré pôsobí nezávisle od Turčianskej bicyklovej skupiny JUS.

2 Výsledky a diskusia

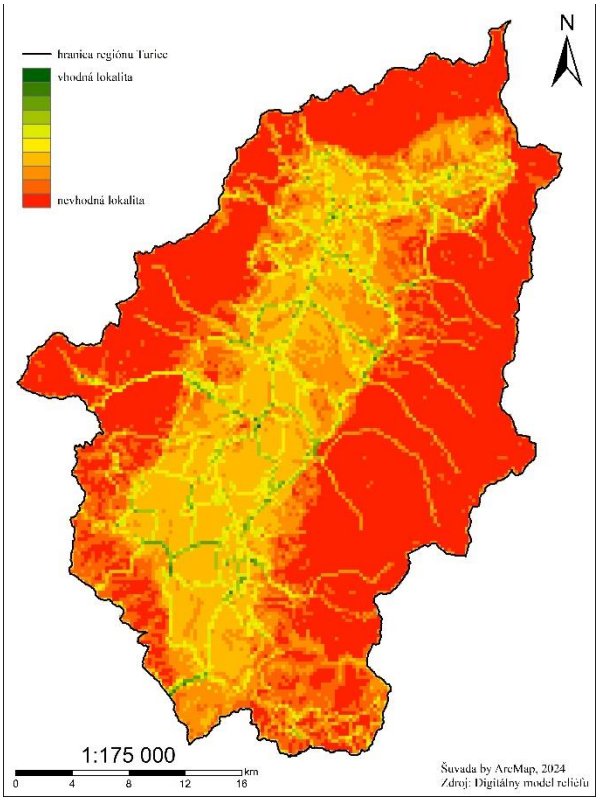
Na základe použitej metodiky sme dokázali vytvoriť niekoľko výstupov, ktorých údaje je možné analyzovať a porovnať tak reálny a teoretický stav cykloturistickej siete v rámci regiónu Turiec. Zároveň sa v samostatnej podkapitole budeme venovať návrhu nových cyklotrás, ktoré sú navrhnuté na základe terénneho prieskumu a výsledkov získaných v prostredí GIS podľa použitej metodiky.

2.1 Index "bicyklovateľnosti" pre reálny stav

Prvým výstupom metodického postupu tvorby indexu "bicyklovateľnosti" pre vybrané územie je zhodnotenie všetkých štyroch vstupných indikátorov (existujúce cyklotrasy, existujúca cestná sieť, zelené a vodné plochy a sklon svahov). V tomto výstupe je možné pozorovať, že prítomnosť cyklotrás na regionálnej úrovni zvyšuje inak nízke hodnoty indexu "bicyklovateľnosti" predovšetkým v podhorských oblastiach a oblastiach dolín Veľkej Fatry. Naopak najvhodnejšie lokality sa nachádzajú v kotlinových oblastiach a ponúkajú pokrytie veľkej časti regiónu (mapa 2). Vďaka poľnohospodárskemu charakteru Turčianskej kotliny je percento zelených plôch relatívne vysoké takmer všade mimo intravilánov obcí. Kladne taktiež vplýva aj relatívne nízky priemerný sklon v rámci kotliny. Ako najvhodnejšie sa ukazujú cyklotrasy v okolí okresného mesta Martin (smerom na JZ cez Košťany, Trnovo a Valču; smerom na JV cez Žabokreky, Belú-Dulice a Necpaly; smerom na S do Vrútok a Turčianskych Kľačian; smerom na V cez Dražkovce do Sklabine, Turčianskeho Jasena a Sklabinského Podzámku), okolo okresného mesta Turčianske Teplice (smerom na J smerom na Dolnú Štubňu a do lesoparku Bôr; smerom na V cez Budiš a Dubové; smerom na V cez Háj a Čremošné; smerom na S cez Turčiansky Michal na Mošovce), ale aj v odľahlejších častiach kotliny (na Z v okolí Kláštora pod Znievom, Moškovca a Vrícka; na SV v okolí Turian, Krpelian, Podhradia a Sučian; v centrálnej časti v okolí Blatnice, Karlovej, Laskára a Socoviec; na J v okolí Skleného a Turčeka). Negatívny vplyv existujúcej cestnej siete na bezpečnosť cyklistov nie je až taký významný, nakoľko po cestách s najväčšou vyťaženosťou (cesty 1. a 2. triedy) prebieha minimum cyklotrás, väčšinou ich len križujú alebo sú súbežné na krátkych úsekoch. Cesty 3. triedy a ostatné okresné cesty sa vyznačujú oveľa menším počtom prechádzajúcich vozidiel, preto sú vhodnejšie pre vyznačovanie cyklotrás a budovanie drobnej cyklistickej infraštruktúry. Názorným príkladom takejto trasy je cyklotrasa č. 032 (alebo aj Cesta SNP) prebiehajúca severným a východným okrajom Turčianskej kotliny, ktorá je medzi cyklistami populárna, často vyhľadávaná a taktiež sa na nej občasne organizujú cyklistické preteky alebo rôzne cyklistické podujatia. V rámci kotlinových častí sú však aj lokality, ktoré podľa použitej metodiky získali pozitívne hodnotenie, no neprebieha nimi žiadna cyklotrasa. Týmto lokalitám sa budeme venovať neskôr v rámci tejto kapitoly.

Vo Veľkej Fatre sa cyklotrasy nachádzajú predovšetkým v dolinách. Medzi najnavštevovanejšie patrí Gaderská, Blatnická, Jasenská a Belianska dolina. Tie ponúkajú drobné cykloturistické vybavenie (vybudované prístrešky, stojany, nabíjačky na elektro bicykle a podobne). Kvôli použitej metodike však majú

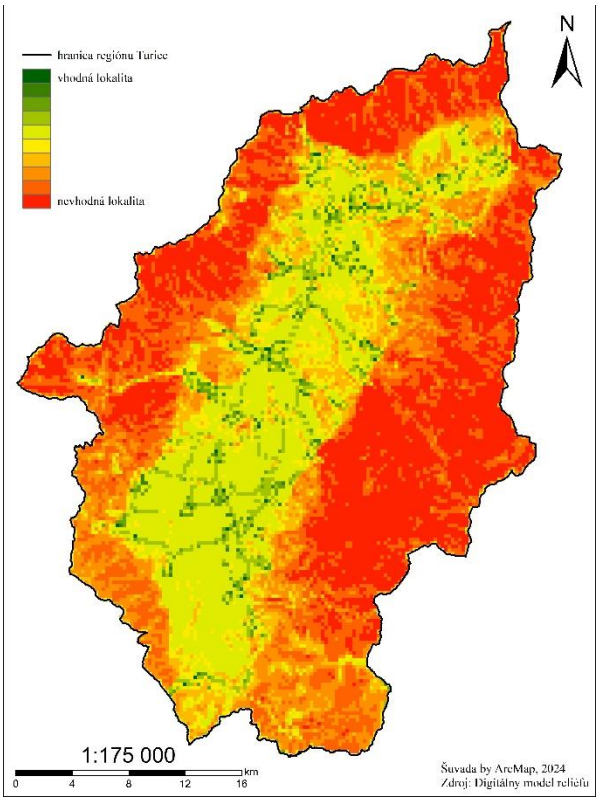
nižšie výsledné hodnoty indexu aj napriek svojej popularite v realite. Spôsobené to je použitím mierky na úrovni regiónu. Charakter terénu v bezprostrednom okolí dolín (strmé svahy okolitých kopcov obklopujú relatívne úzke a mierne stúpajúce údolné časti pozdĺž potokov) v tejto mierke spôsobuje, že sa celá bunka javí ako strmá (na základe priemerného sklonu) a teda nevhodná pre cyklistiku. Avšak pri použití mierky na úrovni obcí a detailnejších vstupných dátach by rozdiel vo výslednom indexe oblasti bol oveľa badateľnejší. Kremnické vrchy (J regiónu) a Žiar (JZ regiónu) majú lepšie hodnotenie v lokalitách kde sa nachádzajú cyklotrasy, ale taktiež sa zobrazujú lokality, ktoré by teoreticky mohli byť vhodné pre cyklotrasy (vďaka absencii cestnej siete a prijateľnému sklonu terénu). Krivánska časť Malej Fatry sa javí byť nevhodná pre cyklistiku, je to spôsobené absenciou oficiálne značených cyklotrás v NP Malá Fatra (lokality vhodné pre vstup s bicyklom sú definované iba v návštevnom poriadku národného parku [11], nie sú však oficiálne značené). Zoficiálnenie týchto trás by malo za následok zvýraznenie konkrétnych línií a zvýšenie výsledného indexu v danej oblasti , tak ako je tomu v prípade dolín Veľkej Fatry.



mapa 2 Index "bicyklovateľnosti" pre reálny stav
zdroj: [6], [7], [8], [9], [10]

2.2 Index "bicyklovateľnosti" pre teoretický stav

Tento výstup, ako bolo spomenuté v kapitole 1, zobrazuje teoretický stav pre vhodnosť cyklotrás v regióne na základe 3 hodnotiacich indikátorov (sklon, krajinná pokrývka a cestná sieť), pričom nebola braná do úvahy existujúca cykloturistická sieť. Výsledkom je výstup, ktorý podporuje výsledok indexu pre reálny stav cykloturistickej siete – kotlinové oblasti majú ešte pozitívnejšie hodnoty indexu (mapa 3). Toto vypovedá o vhodnosti Turčianskej kotliny pre budovanie cykloturistických trás a ešte výraznejšie prepájanie celého regiónu a jednotlivých obcí. Zaujímavé sú aj výsledky v rámci okolitých pohorí. Až na bralnú časť Veľkej Fatry a západnú časť Krivánskej Malej Fatry, dosahujú pohoria podstatne pozitívnejšie hodnotenie ako v prípade indexu pre reálny stav. To otvára možnosti rozvoja horskej cyklistiky v okolitých horách aj mimo dolinových lokalít, pričom by teoreticky mohla byť využitá relatívne hustá sieť lesných ciest, zvážnic a protipožiarnych ciest.



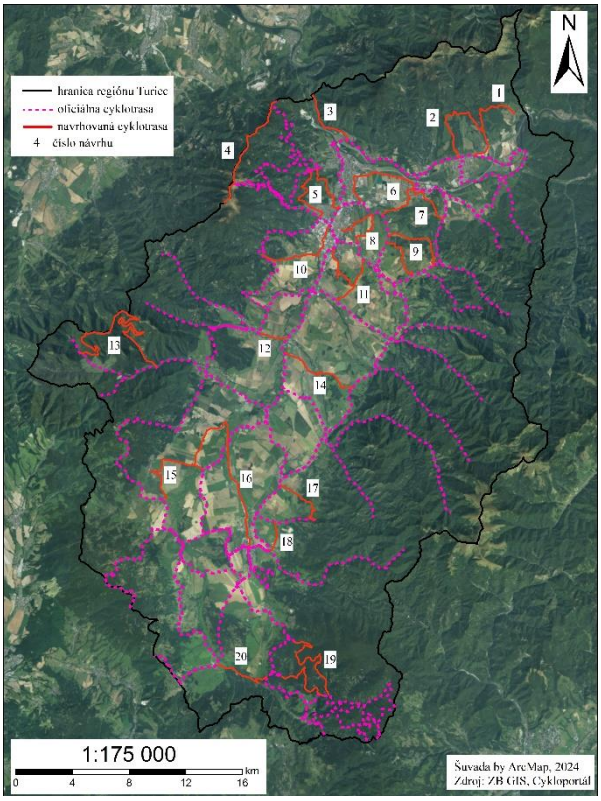
mapa 3: Index "bicyklovateľnosti" pre teoretický stav
zdroj: [7], [8], [9], [10]

Ako je viditeľné na mape 3, centrálne časti kotliny majú najvyššie hodnoty indexu, a preto sú najvhodnejšie pre budovanie cykloturistických trás s nízkou náročnosťou, náučných chodníkov a okruhov vhodných pre rodiny s deťmi. Oblasti v pohoriach (označené žltou až oranžovou farbou) sú vhodné pre budovanie cykloturistických trás so športovým charakterom, ktoré sú charakteristické väčším prevýšením, strmšími stúpaniami a klesaniami a nespevneným povrchom. Práve relatívne hustá sieť zvážnic a lesných ciest by bola vhodným základom pre vyznačovanie trás kategórie SPORT a EXPERT. V tejto mierke však nie je možné určiť presné vedenie týchto trás v teréne, preto je nutné poznať miestny terén, sieť zvážnic a lesných ciest a určiť konkrétne vedenie jednotlivých trás, ktoré by bolo z veľkej časti zjazdné aspoň v jednom smere alebo by spĺňali podmienky stanovené správami jednotlivých národných parkov, prípadne vytvoriť nový výstup skúmaného indexu vo väčšom rozlíšení a v mierke maximálne 1: 50 000.

V nasledujúcej podkapitole sa na základe výsledkov teoretického indexu pokúsime vytýčiť presné vedenia nových trás, ktoré by efektívne prepojili a sprístupnili ďalšie obce v regióne a zároveň by sme definovali trasy v horskom prostredí, ktoré by ponúkli atraktívne možnosti aj pre náročnejších cyklistov.

2.3 Návrhy nových cyklotrás

Ako už bolo spomenuté v podkapitole 2.2, index pre teoretický stav otvára veľké množstvo možností pre rozvoj horskej cyklistiky za predpokladu, že dôjde k odobreniu použitia siete lesných a protipožiarnych ciest zainteresovanými inštitúciami. V tejto podkapitole sa však zameriame nielen na horské oblasti, ale taktiež aj na oblasti kotlinové, kde sa v súčasnej dobe nenachádzajú oficiálne značené cyklotrasy. Niektoré obce nemajú priame prepojenie oficiálnou cyklotrasou so susednými obcami, pričom priame prepojenie týchto susedných obcí existuje v podobe cestnej komunikácie alebo poľnej, resp. lesnej cesty vhodnej pre vjazd na bicykli, je však potrebné ich vyznačenie do podoby oficiálnej cyklotrasy. Výsledkom práce v prostredí GIS, terénnym prieskumom a konzultáciou s OZ Turiec Trails je vytvorenie návrhu 20 nových cyklotrás (mapa 4), ktoré v tejto kapitole popíšeme.



mapa 4: Navrhované cyklotrasy v regióne Turiec
zdroj: [6], [8]

Navrhované trasy č. 1, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 15, 16 a 18 by predstavovali priame prepojenia medzi jednotlivými obcami. Tie návrhy, ktorých vedenie by vyžadovalo priebeh popri cestách 1. alebo 2. triedy (tj. 1 – Šútovo – Turany; 12 – Príbovce – Benice – Valča; 14 – Folkušová – Ďanová – Rakovo; 20 – Turček – Sklené) by bolo nutné posúdiť z hľadiska bezpečnosti cestnej premávky a v ideálnom prípade navrhnúť súbežné teleso cyklotrasy separátne umiestnené od cestnej komunikácie a v prípade križovania týchto ciest navrhnúť mimoúrovňové vedenie (napríklad podjazdom cestnej komunikácie) podľa TP 085 o navrhovaní cyklistickej infraštruktúry [12]. V prípade návrhu č. 12 by bolo možné medzi obcami Príbovce a Benice využiť existujúce teleso chodníka vedené za zvodidlami, pričom by toto teleso bolo značením rozdelené na pruh pre cyklistov a pruh pre chodcov. Návrhy č. 7 (Sučany – Turčianska Štiavnička), 10 (Martin – Bystrička), 15 (Kaľamenová – Slovenské Právno – Moškovec – Jazernica) a 16 (Turčianske Teplice – Malý Čepčín – Jazernica) vedú v určitých častiach po cestách 3. triedy s relatívne nízkou frekvenciou automobilovej dopravy. Na základe znenia TP 085 [12] je možné viesť cyklotrasu po týchto cestách, preto by nemalo vznikať

veľké riziko ohrozenia života a zdravia účastníkov cestnej premávky. Návrhy cyklotrás č. 6 (Martin – Sučany – Vrútky), 11 (Dražkovce – Žabokreky s odbočkou na Martin, miestna časť Ľadoveň) a 18 (Rakša – Háj) by neviedli po cestách 1., 2. ani 3. triedy, využívali by miestne poľné, asfaltové a poľnohospodárske približovacie cesty a vytvorili by najbližšie možné priame spojenie medzi relatívne blízko seba situovanými obcami, medzi ktorými doteraz nebolo vybudované takéto prepojenie.

Návrhy cyklotrás č. 2 (Turany, miestna časť Černík – Turany, miestna časť Vaňkovská), 3 (Lipovec – Nezbudská Lúčka, chatová osada Jánošíkovo), 5 (Martin, miestna časť Košúty – Martin, miestna časť Kolónia Hviezda – Martin, miestna časť Stráne a Podháj), 8 (Martin, miestna časť Tomčany – Martin, miestna časť Mestská Bôrová – Martin, centrum) a 9 (Sklabiňa – Sklabinský Podzámok, osada Stará Bôrová – Diaková – Dražkovce), 19 (Horná Štubňa – VN Turček – cyklotrasa 032) by predstavovali rekreačné až športovo orientované cyklotrasy v prírodnom, respektíve poľnohospodárskom prostredí s prevahou lesov, lúk a pasienkov s možnosťou spoznávania aj menej známych lokalít regiónu. Pre ich vedenie by mohla byť použitá sieť lesných a poľných ciest. Ide o trasy s miestami strmším sklonom, poväčšine vedené mimo asfaltových ciest, respektíve po asfaltových cestách so zlou kvalitou asfaltu a po šotolinovom a prachovom povrchu, kde je zvýšené riziko šmyku a následného pádu, preto sú tieto návrhy vhodné skôr pre horskú cyklistiku. Návrh č. 17 (Mošovce – Rakša, turistický rázcestník Mača) by bol predĺžením cyklotrasy č. 5432 až do obce Mošovce. Vedenie trasy by sa od pôvodnej cyklotrasy oddeľovalo pri turistickom rázcestníku Mača na sever po lesnej ceste situovanej vo svahu a po prekonaní krátkeho stúpania by trasa klesala po lúkach až do Mošoviec, do oblasti kempu a kúpaliska, pričom nižšie v obci by došlo k jej pripojeniu k cyklotrase č. 032.

Návrhy cyklotrás č. 4 (vysielač Krížava – Minčol – Saračníky) a 13 (Vrícko, miestna časť Záskalná – Janková – Skalky – Vrícko, kemp) by predstavovali trasy pre skúsených, náročných a technicky zdatných cyklistov. Išlo by o cyklotrasy vedené po hrebeňových oblastiach Lúčanskej Malej Fatry, ktoré sú jednosmerne zjazdné. V prípade návrhu č. 4 ide o jednosmernú trasu (z J na S) vedenú po relatívne širokom turistickom chodníku z Martinských holí po skalných, šotolinových a prachových chodníkoch s nutnými vedomosťami práce s bicyklom v náročnom teréne. Trasa č. 13 je zjazdná v smere z V na Z, pričom nástupová trasa na hrebeňové pasáže by viedla po miestnych lesných cestách. Po hrebeni samotnom by viedla trasa súbežne s turistickou trasou, v západnej časti sa z hrebeňa odpája lesná cesta, ktorou je možné zísť až na S okraj obce Vrícko, do oblasti miestneho kempu.

V prípade snahy o zoficiálnenie cyklotrás vedených mimo ciest, po lesných a poľnohospodárskych cestách a pozemkoch by bol postup náročnejší ako v prípade trás, ktoré využívajú už vybudované komunikácie. Tým, že cyklotrasy sa nachádzajú v extraviláne, v lesnatých a trávnatých oblastiach, v prvom rade by bola nutná dohoda s vlastníkmi príslušných lesných a poľnohospodárskych pozemkov, respektíve s poverenými urbárskymi spoločnosťami. Potrebná je oficiálna dohoda alebo zmluva medzi zainteresovanými skupinami o využívaní pozemkov na účely budovania cyklotrás a drobnej cyklistickej infraštruktúry. Celé územie regiónu je rozdelené medzi správy NP Veľká Fatra a NP Malá Fatra [13]. Samotná kotlina, Lúčanská časť Malej Fatry, Turčianska časť Kremnických vrchov a Žiaru spolu s celou Veľkou Fatrou patria do kompetenčného územia NP Veľká Fatra, preto by bola nutná komunikácia so správou tohto národného parku, kde by boli prekonzultované možnosti vytvorenia cyklotrás v daných lokalitách z hľadiska vplyvu na životné prostredie a prítomné biotopy. Do kompetenčného územia NP Malá Fatra patria návrhy č. 1, 2 a 3, pričom by došlo k obdobnému procesu špecializovaného posudzovania vplyvu na životné prostredie. Okrem komunikácie s NP Veľká Fatra a NP Malá Fatra by bola nutná aj komunikácia s predstavenstvom KST Slovensko, ktoré by vyjadrilo súhlas/nesúhlas a prípadné výhrady a pripomienky k vedeniu cyklotrás po turistických chodníkoch, respektíve by navrhlo ich vedenie mimo turistických chodníkov po alternatívnej trase. V prípade okresu Martin a Turčianske Teplice by bolo nutné predloženie návrhov na budovanie cyklotrás spolu s priloženým plánom realizovaného projektu a priloženého GPS súboru, v prípade budovania prístreškov alebo objektov s pevnými základmi, rozšírila by sa komunikácia s okresným úradom aj o poverené pracovisko stavebného úradu.

Výsledky získané aplikovaním použitej metodiky sú uplatniteľné na regionálnej úrovni, no pre potreby mikroregionálneho hodnotenia, resp. hodnotenia na úrovní obcí, by museli byť vstupné údaje hodnotiacich indikátorov (predovšetkým sklon) vo väčšom rozlíšení (ideálne 1x1 m) a jednotlivé bunky by museli mať oveľa menšiu veľkosť (rádovo v metroch až desiatkach metrov). Zároveň by bolo potrebné doplniť ďalšie

indikátory, ktoré by boli smerodajné pre tvorbu výsledného indexu na konkrétnom území [14].

Záver

Na základe použitej metodiky a dostupných zdrojov informácií sme vytvorili hodnotenie regiónu Turiec z pohľadu vhodnosti existujúcej cykloturistickej siete v priestore. Existujúca cykloturistická sieť, pokrývajúca značnú časť regiónu, má svoju najvyššiu hustotu v kotlinovej oblasti regiónu, čo korešponduje s dosiahnutými výsledkami, kde sa ukázali najvhodnejšie lokality pre cykloturistiku podľa vybraných hodnotiacich indikátorov.

Taktiež sme vytvorili alternatívny výstup, vďaka ktorému sme navrhli nové cyklotrasy. Tieto trasy by mohli byť návrhom pre ďalšie posudzovanie kompetentnými inštitúciami a vybudovanie týchto cyklotrás by znamenalo rozšírenie cykloturistickej siete v Turci, vzájomné prepojenie ďalších obcí v rámci regiónu a zároveň by to mohlo teoreticky viesť ku zvýšenej atraktivite pre rôzne skupiny účastníkov cykloturizmu.

Poďakovanie

Ďakujem svojej školiteľke, RNDr. Michaele Žoncovej, PhD., za pomoc, podporu, praktické rady a nápady pri tvorbe tohto príspevku. Zároveň ďakujem aj Ing. Michalovi Bartošovi, PhD. z OZ Turiec Trails za poskytnutú pomoc a konzultáciu o procese legalizovania cyklotrás a trailov.

Použitá literatúra

[1] MATLOVIČOVÁ, Kvetoslava – KLAMÁR, Radoslav – MIKA, Miroslaw. 2015. Turistika a jej formy. Prešovská univerzita. Grafotlač Prešov, 550 s. ISBN 978-80-555-1530-4.

[2] Projekt Cyklotrasa Martin – Vrútky. [online]. ITMS 2014+: 2024. [cit. 23.2.2024]. Dostupné z: https://www.itms2014.sk/prehlad-projektov/projekty?ff=b0QiHExeLb4ASHfUVCfG_Amsva63e_KouvJjB8P87EDOnI7BLWkMkdeNNhJglibmYSfevae2cE4EEdjxO9xScNIb.

[3] Fond malých projektov: úspešné projekty. [online]. Žilinský samosprávny kraj: 2021. [cit. 22.2.2024]. Dostupné z: https://www.zilinskazupa.sk/files/priloha2_fmp_uspesne-projekty_6c_5.pdf.

[4] Strategické dokumenty ŽSK: Okres Martin. [online]. Žilinský samosprávny kraj: 2024. [cit. 22.2.2024]. Dostupné z: https://www.zilinskazupa.sk/sk/strategicke-dokumenty-zsk/okres-martin.html.

[5] KRENN, Patricia Jasmine – OJA, Pekka – TITZE, Sylvia, 2015. Development of a Bikeability Index to Assess the Bicycle-Friendliness of Urban Environments. [online]. In: Open Journal of Civil Engineering, 5. Scientific Research: 2015. [cit. 19.2.2024] Dostupné z: Development of a Bikeability Index to Assess the Bicycle-Friendliness of Urban Environments (scirp.org).

[6] Žilinský kraj: Cyklotrasy na mape. [online]. Cykloportál: 2024. [cit. 25.2.2024]. Dostupné z: https://za.cykloportal.sk/cyklotrasy-na-mape/.

[7] Copernicus: Corine Land Cover 2018. [online]. Copernicus: 2024 [cit. 24.2. 2024]. Dostupné z: https://land.copernicus.eu/pan-european/corine-land-cover/clc2018

[8] Mapový klient ZB GIS. [online]. Geoportál: 2024. [cit. 22.2.2024]. Dostupné z: https://www.geoportal.sk/sk/sluzby/aplikacie/mapovy-klient-zbgis/.

[9] Mapy cestnej siete SR – mapy okresov 50 000: Martin, rozmery 65x55cm. [online]. Cestná databanka: 2023. [cit. 22.2.2024]. Dostupné z: https://www.cdb.sk/files/galleries/mapy-okresov-50-000/martin_50-000.jpg.

[10] Mapy cestnej siete SR – mapy okresov 50 000: Turčianske Teplice, rozmery 55x55cm. [online]. Cestná databanka: 2023. [cit. 22.2.2024]. Dostupné z: https://www.cdb.sk/files/galleries/mapy-okresov-50-000/turcianske_teplice_50-000.jpg.

[11] Návštevný poriadok. [online]. Národný park Malá Fatra: 2024. [cit. 25.2.2024]. Dostupné z: https://www.npmalafatra.sk/navstevnici/navstevny-poriadok/.

[12] Technické podmienky: Navrhovanie cyklistickej infraštruktúry. [online]. Ministerstvo dopravy a výstavby SR: 2019. [cit. 26.2.2024]. Dostupné z: https://www.ssc.sk/files/documents/technicke-predpisy/tp/tp_085.pdf.

[13] Mapový portál KIMS: kompetencie ŠOP. [online]. Komplexný informačný a monitorovací systém: 2014. [cit. 24.2.2024]. Dostupné z: https://webgis.biomonitoring.sk/.

[14] SCHMID-QUERG, Jonas – KELER, Andreas – GRIGOROPOULOS, Georgios. 2021. The Munich bikeability index: A practical approach for measuring urban bikeability. [online] In Sustainability, 13, 1, 2021. [cit. 27.2.2024]. Dostupné z: https://www.mdpi.com/2071-1050/13/1/428#.

FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED UNIVERZITY MATEJA BELA

UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED A INFORMATIKY

Sekcia

Chémia, fyzika, matematika

Implikátory na konečných reťazcoch

Implicators on finite chains

Saskia Balážová[1]
školiteľ: Vladimír Janiš[2]
[1,2]Katedra matematiky, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica
[1]saskia.balazova@student.umb.sk, [2]vladimir.janis@umb.sk

Abstrakt

V práci sa zaoberáme implikátormi, ktoré sú rozšírením implikácie ako logickej operácie z klasickej logiky na viachodnotové logiky (nazývané aj fuzzy logiky). Zaoberáme sa implikátormi na konečných reťazcoch a pomocou výpočtových metód určujeme ich počet pre reťazce dĺžky maximálne 5.

Okrem štandardných implikátorov sme sa venovali aj smooth implikátorom, ktoré predstavujú istý druh spojitosti v diskrétnom kontexte. Tieto smooth implikátory sú analógom smooth triangulárnych noriem, ktoré vo viachodnotových logikách reprezentujú operáciu konjunkcie.

V závere sme zhodnotili dosiahnuté výsledky a formulovali problém pre ďalší výskum v oblasti viachodnotových logík, kde najväčšou výzvou je získať explicitnú formulu pre počet implikátorov na konečných reťazcoch.

Kľúčové slová: implikácia, viachodnotová logika, fuzzy logika, implikátor

Abstract

We deal with implicators, that are extensions of the logical operation of implication to many-valued logics (called also fuzzy logics). We study implicators on finite chains and using computational methods we estimate their number on chains of the length up to 5.

Besides usual implicators we also work wit smooth implicators, that represent a kind of continuity in a discrete framework. These are analogical to smooth triangular norms that represent a conjunction in mutivalued logics.

Finally we summarise obtained results and formulate a problem for the future research, where the crucial task is to find an explicit formula for the number of implicators on finite chains.

Key words: implication, many-valued logic, fuzzy logic, implicator

Úvod

V každodennom živote sa stretávame so situáciami, ktorých komplexnosť nie je možné úplne zachytiť výrokovou logikou. Nie každý výrok sme totižto schopní jednoznačne klasifikovať ako pravdivý alebo nepravdivý.

Klasická dvojhodnotová logika odzrkadľuje čiernobiely svet, po ktorom už od pradávnych čias intuitívne túžime. Jasné a presne ohraničené definovanie okolitého sveta a vzťahov v ňom však nie je možné. Bežne často používame vyjadrenia ako napr. mladá žena, malá odchýlka, silný vietor, takmer žiadna zmena. Tieto vyjadrenia sú nejasné, no vieme s nimi narábať.

Vzťah medzi presnosťou a nepresnosťou skúma teória neurčitosti a fuzzy logika. V tejto práci sa budeme venovať implikátorom vo fuzzy logike. V prvej kapitole sa oboznámime so základnými pojmami. V druhej kapitole si rozoberieme implikácie vo viachodnotovej fuzzy logike, tretia kapitola bude ukážkou jej aplikovania.

1 Základné pojmy

Predstavme si, že máme kopu piesku. Ak z tejto kopy zoberieme jedno zrnko, zvyšok bude stále považovaný za kopu piesku, pretože vďaka jednému zrnku kopa nezanikne ani nevznikne. Ak budeme z tejto kopy uberať po jednom zrnku dostatočne dlho, nakoniec nám síce nezostane nič, ale podľa predchádzajúceho to bude stále kopa piesku. Pojem kopy je vágny, neexistuje ostrý prechod medzi tým, kedy nejaké množstvo kopou je a kedy už kopou nie je. Je zrejmé, že klasické hodnotenie „áno-nie“ na popis nejakého množstva ako kopy nie je vhodné.

Veľa situácií v bežnom živote je takých, že dve pravdivostné hodnoty nestačia na vystihnutie všetkých možností. Prvý, kto zaviedol trojhodnotovú logiku bol v roku 1920 poľský matematik Ján Łukasiewicz, ktorý v článku [1] pracoval s pravdivostnými hodnotami $0, \frac{1}{2}$ a 1, zodpovedajúcimi odpovediam „nie, neviem, áno“.

Fuzzy množiny nachádzajú široké uplatnenie vo viachodnotových logikách. Ich základným princípom je schopnosť priraďovať prvkom množiny stupeň príslušnosti na základe určitých charakteristík. Logiky, v ktorých pravdivostné hodnoty sú reálne čísla z intervalu $[0, 1]$ sú takzvané fuzzy logiky. Kým klasická dvojhodnotová logika súvisí s klasickou teóriou množín, fuzzy logiky súvisia s teóriou fuzzy množín. Základné informácie o tejto problematike podáva napríklad publikácia [2].

Vo výrokovej logike sú pravdivostné hodnoty implikácie zadávané tabuľkou:

p	q	$p \Rightarrow q$
0	0	1
0	1	1
1	0	0
1	1	1

Na implikáciu sa môžeme pozerať ako na funkciu $i : \{0,1\}^2 \to \{0,1\}$, ktorá má hodnoty $i(0,0) = 1, i(0,1) = 1, i(1,0) = 0, i(1,1) = 1$. Ak sa hodnota prvého argumentu zväčší (pri zachovaní hodnoty druhého argumentu), hodnota funkcie i sa zmenší alebo zostane rovnaká, čiže funkcia $i(., y)$ je nerastúca. Situácia je opačná pri druhom argumente.

Jednoduchá úvaha ukazuje, že takáto monotónnosť oboch uvedených funkcií dáva rozumný zmysel aj v prípade viachodnotovej logiky. Preto v nej definujeme zobrazenie implikátor, ktoré prirodzeným spôsobom rozširuje pojem implikácie z klasickej logiky, nasledujúcim spôsobom.

Definícia 1 *Fuzzy implikátor je funkcia* $I : [0,1]^2 \to [0,1]$*, ktorá má vlastnosti* $I(0,0) = I(0,1) = I(1,1) = 1, I(1,0) = 0$*, je nerastúca v prvom argumente a neklesajúca v druhom argumente.*

Okrem implikátorov zavedených v predchádzajúcej definícii má zmysel uvažovať aj o takzvaných smooth implikátoroch:

Definícia 2 *Smooth fuzzy implikátor je fuzzy implikátor, pre ktorý platí: Ak pre* $x_1, x_2 \in \{1, 2, \ldots, n\}$ *je* $|x_1 - x_2| \leq 1$ *tak pre každé* $y \in \{1, 2, \ldots, n\}$ *je* $|I(x_1, y) - I(x_2, y)| \leq 1$ *a ak pre* $y_1, y_2 \in \{1, 2, \ldots, n\}$ *je* $|y_1 - y_2| \leq 1$ *tak pre každé* $x \in \{1, 2, \ldots, n\}$ *je* $|I(x, y_1) - I(x, y_2)| \leq 1$.

Vidíme, že vlastnosť smooth implikátoru je istým spôsobom analógiou spojitosti v diskrétnom kontexte. Smooth implikátory súvisia s výskumom smooth triangulárnych noriem ([3]), ktoré vo viachodnotových logikách reprezentujú operáciu konjunkcie.

2 Výsledky a diskusia

V tejto práci sa budeme zaoberať implikátormi na konečných reťazcoch, ktorých prvky označíme symbolmi $1, 2, \ldots, n$. Teda symbol 1 zodpovedá pravdivostnej hodnote nula v klasickej logike, kým symbol n pravdivostnej hodnote jedna z klasickej logiky.

Každý implikátor na takomto reťazci teda môžeme reprezentovať štvorcovou maticou stupňa n. Z definície implikátora vidíme, že takáto matica má v prvom riadku a v poslednom stĺpci hodnoty n, ako aj hodnotu 1 na prvom mieste v poslednom riadku.

$$\begin{pmatrix} n & n & \ldots & n \\ & & & n \\ & & & \vdots \\ 1 & & & n \end{pmatrix}$$

Podmienky pre monotónnosť implikátora nám zároveň hovoria, že v takejto matici musia riadky tvoriť neklesajúce $n-$tice, kým stĺpce zasa nerastúce $n-$tice.

Pokúsili sme sa stanoviť počet takýchto matíc (a teda implikátorov) pre hodnoty $n \in \{2, 3, 4, 5\}$.

V tejto časti uvedieme výsledky programu v jazyku Python. Tento program generuje a zobrazuje matice, ktoré reprezentujú implikátory na konečných reťazcoch. Tieto matice obsahujú hodnoty v rozsahu od 1 po n. Vytvorený program má uľahčiť a urýchliť proces generovania týchto matíc. Namiesto manuálneho vytvárania matíc metódou pero - papier, čo by bolo veľmi časovo náročné, ich tento program generuje automatizovane.

Predkladáme jednoduché vysvetlenie ako sa matice generujú:

1. Inicializácia matice: Program je zostrojený tak, že na začiatku sa vytvára objekt *matica* pre konkrétnu hodnotu n. Vytvára sa štvorcová matica s rozmermi $n \times n$, kde každá bunka má hodnotu 1.

2. Generovanie matice: Program rekurzívne postupne mení hodnoty v matici tak, aby vytvoril rôzne implikátory. Začína sa v pravom hornom rohu matice a postupuje sa smerom k dolnému ľavému rohu. Pre každú bunku matice sa postupne zvyšujú hodnoty, pričom sa zabezpečuje, aby hodnota v každom riadku zostala neklesajúca a v každom stĺpci nerastúca.

3. Zápis: Po zmene hodnoty v matici sa táto nová verzia matice zapíše do zoznamu *result*, aby sa mohla neskôr vypísať.

4. Výpis matíc: Nakoniec sa vypíše každá jedinečná verzia matice z *result* zoznamu, pričom sa odstránia duplikáty. Tieto matice predstavujú rôzne implikátory na konečných reťazcoch pre danú hodnotu n.

Teraz si ukážeme maticu (teda implikátor) pre hodnotu $n = 2$. Keďže existuje len jedna taká, ktorá spĺňa podmienky, môžeme si ukázať ako by vyzerala ručne napísaná matica a ako vyzerá matica vytvorená v prostredí Python.

Obr. 1: Časť programu v jazyku Python na generovanie matíc

```
def generate(self, i, j):
    if i < 0 or j >= self.n or (i == 0 and j == self.n-1):
        return
    # postupne zvysuj vsetky nalavo
    while self.value[j][i]+1 <= self.value[j][i+1]
            and self.value[j][i]+1 <= self.value[j-1][i]:
        # zvys hodnotu
        self.value[j][i] += 1
        # zobraz
        self.zapis()
        # rekurzivne pozvysuj dole
        self.reset(i, j)
        self.zapis()
        self.generate(self.n - 2, j + 1)
        # rekurzivne pozvysuj dolava
        self.generate(i-1, j)
```

Obr. 2: Ručne vytvorená matica pre hodnotu $n = 2$

$$\begin{pmatrix} 2 & 2 \\ 1 & 2 \end{pmatrix}$$

Obr. 3: Matica pre hodnotu $n = 2$ vytvorená pomocou programu v jazyku Python

```
[[2. 2.]
 [1. 2.]]
pocet: 1
```

Pre hodnotu $n = 3$ dostávame 14 takýchto matíc a pre $n = 4$ už 805, vidíme teda, že počet implikátorov rýchlo narastá.

Pre $n = 5$ sme museli použiť výkonejší počítač na Katedre informatiky Fakulty prírodných vied Univerzity Mateja Bela, výpočet bol už náročnejší, trval približne 15 minút a našlo sa 208 152 matíc (teda implikátorov) spĺňajúcich podmienky.

Ďalej sme sa pokúsili stanoviť počet smooth matíc pre hodnoty $n \in \{2, 3, 4, 5\}$.

Po menšej modifikácii nášho kódu v prostredí Python, kde sme pridali funkciu $test_smoothness$, ktorá testuje, teda kontroluje, či matice spĺňajú vlastnosť smooth implikátora, sme program znovu spustili pre hodnoty $n \in \{2, 3, 4, 5\}$.

Obr. 4: Matice pre hodnotu $n = 3$ vytvorené pomocou programu v jazyku Python

```
[[3. 3. 3.]                    [[3. 3. 3.]
 [1. 1. 3.]                     [1. 3. 3.]
 [1. 1. 3.]]                    [1. 2. 3.]]

[[3. 3. 3.]                    [[3. 3. 3.]
 [1. 2. 3.]                     [1. 3. 3.]
 [1. 1. 3.]]                    [1. 3. 3.]]

[[3. 3. 3.]                    [[3. 3. 3.]
 [1. 2. 3.]                     [2. 3. 3.]
 [1. 2. 3.]]                    [1. 3. 3.]]

[[3. 3. 3.]                    [[3. 3. 3.]
 [2. 2. 3.]                     [2. 3. 3.]
 [1. 2. 3.]]                    [1. 1. 3.]]

[[3. 3. 3.]                    [[3. 3. 3.]
 [2. 2. 3.]                     [3. 3. 3.]
 [1. 1. 3.]]                    [1. 3. 3.]]

[[3. 3. 3.]                    [[3. 3. 3.]
 [2. 3. 3.]                     [3. 3. 3.]
 [1. 2. 3.]]                    [1. 1. 3.]]

[[3. 3. 3.]                    [[3. 3. 3.]
 [1. 3. 3.]                     [3. 3. 3.]
 [1. 1. 3.]]                    [1. 2. 3.]]

                               pocet: 14
```

Obr. 5: Pridaná časť programu v jazyku Python na testovanie vlastnosti smooth implikátora

```
def test_smoothness(self, x):
    # ziadni susedia nemozu byt viac ako 1
    for i in range(self.n):
        for j in range(self.n):
            if i < self.n-1 and abs(x[i][j] - x[i+1][j]) > 1:
                return False
            if j < self.n-1 and abs(x[i][j] - x[i][j+1]) > 1:
                return False
    return True
```

Obr. 6: Matice pre hodnotu $n = 3$ vytvorené pomocou modifikovaného programu v jazyku Python

```
[[3. 3. 3.]          [[3. 3. 3.]
 [1. 1. 3.]           [1. 3. 3.]
 [1. 1. 3.]]          [1. 2. 3.]]

[[3. 3. 3.]          [[3. 3. 3.]
 [1. 2. 3.]           [1. 3. 3.]
 [1. 1. 3.]]          [1. 3. 3.]]

[[3. 3. 3.]          [[3. 3. 3.]
 [1. 2. 3.]           [2. 3. 3.]
 [1. 2. 3.]]          [1. 3. 3.]]

[[3. 3. 3.]          [[3. 3. 3.]
 [2. 2. 3.]           [2. 3. 3.]
 [1. 2. 3.]] tato!    [1. 1. 3.]]

[[3. 3. 3.]          [[3. 3. 3.]
 [2. 2. 3.]           [3. 3. 3.]
 [1. 1. 3.]]          [1. 3. 3.]]

[[3. 3. 3.]          [[3. 3. 3.]
 [2. 3. 3.]           [3. 3. 3.]
 [1. 2. 3.]] tato!    [1. 1. 3.]]

[[3. 3. 3.]          [[3. 3. 3.]
 [1. 3. 3.]           [3. 3. 3.]
 [1. 1. 3.]]          [1. 2. 3.]]

                     pocet: 14
                     pocet smooth: 2
                     trvanie: 0.0032944679260253906
```

Celkový výstup kódu teraz zahŕňa aj počet matíc, ktoré majú vlastnosť smooth implikátora. Kód taktiež vypočíta celkový čas (v sekundách), ktorý bol potrebný na vygenerovanie všetkých matíc, a na konci výpisu vypíše počet implikátorov, počet smooth implikátorov a potrebný čas na ich generovanie.

Počty implikátorov a smooth implikátorov pre jednotlivé dĺžky reťazcov sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

n	implikátory	smooth implikátory
2	1	1
3	14	2
4	805	7
5	208 152	42

3 Záver

V našej práci sme preskúmali a analyzovali implikátory na konečných reťazcoch ako rozšírenie tradičnej implikácie z klasickej logiky na viachodnotové logiky. Našim hlavným cieľom bolo prostredníctvom výpočtových metód určiť počet týchto implikátorov pre reťazce s maximálnou dĺžkou 5. Prostredníctvom nášho programu v jazyku Python sme úspešne demonštrovali proces generovania a analýzy týchto implikátorov. Jeho automatizovaný proces generovania matíc uľahčuje výskum a štúdium implikátorov na konečných reťazcoch, pretože umožňuje rýchlejšie preskúmanie rôznych variantov implikátorov a ich vlastností. Týmto spôsobom program prispieva k efektívnejšiemu výskumu a lepšiemu pochopeniu viachodnotových logík.

Výsledky našej práce majú teoretický význam pre viachodnotové logiky, pričom zároveň poskytujú základ pre ich praktické využitie, napr. v teórii rozhodovania. Táto práca otvára dvere pre ďalší výskum v oblasti viachodnotových logík a prispieva k rozšíreniu našich znalostí o ich aplikáciách a možnostiach. Bolo by, pochopiteľne, veľmi zaujímavé získať explicitnú formulu pre počet implikátorov na reťazcoch, avšak nakoľko toto nie je vyriešené ani pre jednoduchší prípad triangulárnych noriem (aj v práci [3] autori uvádzajú iba výpočtom získané hodnoty pre reťazce maximálnej dĺžky 14), zrejme nepôjde ani zďaleka o jednoduchú úlohu.

Napriek dosiahnutému pokroku v tejto oblasti zostáva priestor pre ďalší výskum a zdokonaľovanie existujúcich metód a techník. Veríme, že naša práca bude podnetom pre ďalšie štúdie a projekty v tejto dynamicky sa rozvíjajúcej oblasti.

Poďakovanie

Týmto by som sa chcela poďakovať školiteľovi prof. RNDr. Vladimírovi Janišovi, CSc. za ochotu a cenné rady počas písania tejto práce. Taktiež by som sa chcela poďakovať Mgr. Michalovi Vagačovi, PhD. za jeho neoceniteľnú pomoc, jeho odborné vedenie a cenné rady, ktoré boli kľúčové pri vytvorení programu v prostredí Python na stanovenie počtu matíc reprezentujúcich implikátory na konečných reťazcoch.

Literatúra

[1] Łukasiewicz J. (1920) O logice trójwartościowej, „Ruch Filozoficzny" 5, p. 170-171

[2] Kolesárová A., Kováčová M. (2004) Fuzzy množiny a ich aplikácie. Slovenská technická univerzita v Bratislave, Bratislava

[3] De Baets B., Mesiar R. (1999) Triangular Norms on Product Lattices. Fuzzy Sets and Systems, 104, p. 61-75

[4] Fuzzy logika a fuzzy množiny [Citované: 5. marec 2024] `http://www2.fiit.stuba.sk/~kvasnicka/Logika/Lecture10/10.prezentacia.pdf`

[5] Groman G. (2012) Fuzzy logika a jej aktuálne aplikácie. (Bakalárska práca) Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava

Príprava a charakterizácia inovatívneho sorbentu AsO_4^{3-} iónov na báze Mg-modifikovaného biouhlia

Preparation and characterization of an innovative Mg-modified biochar-based sorbent for AsO_4^{3-}ions

Kristína Beliančínová[1] – Gerhard Soja[2]
Školiteľ: Vladimír Frišták[3]
[1,3]Katedra chémie, PdF TRUNI, Priemyselná 4, 917 01 Trnava
[2]Institute of Chemical and Energy Engineering, BOKU, Muthgasse 107, 1190 Viedeň
[1] kristina.beliancinova@tvu.sk, [2] gerhard.soja@boku.ac.at, [3]vladimir.fristak@truni.sk

Abstrakt
Využitie biouhlia ako pomerne efektívneho sorbentu, resp. stacionárnej fázy pre separáciu a prekoncentráciu širokej škály analytov, predstavuje inovatívny prístup v súčasných metódach predúpravy vzorky. Vhodná predpyrolýzna úprava vstupného prekurzora, resp. postpyrolýzna modifikácia pyrolýzneho produktu, umožňuje cielené dizajnovanie fyzikálno-chemických vlastností a sorpčných charakteristík výsledného sorbentu. V experimentálnej časti práce sme sa venovali príprave pyrolýznych materiálov na báze nemodifikovanej biomasy listov pálky širokolistej (BC) a jej Mg modifikovaného analógu (MgBC) procesom pomalej pyrolýzy. Fyzikálno-chemická charakterizácia BC a MgBC potvrdila významné morfologické a mineralogické rozdiely medzi pripravenými sorbentmi. Realizáciou sorpčných experimentov sme zistili, že sorpčná kapacita MgBC pre As je 63-násobne vyššia ako v prípade BC. Sorbent MgBC preukázal v modelovej SPE kolónke 35 % retenciu As. Na základe získaných poznatkov je zrejmé, že sorbent na báze biouhlia pripraveného z Mg-modifikovaného prekurzora predstavuje efektívny sorbent pre aniónové formy analytov.

Kľúčové slová: extrakcia tuhou fázou, biouhlie, As, sorpcia, modifikácia

Abstract
The utilization of biochar as a relatively efficient sorbent or stationary phase for the separation and preconcentration of a wide range of analytes represents an innovative approach in current sample pretreatment methods. Appropriate pre- and post-pyrolysis modification of the input precursor and pyrolysis product, respectively, allows targeted design of the physicochemical properties and sorption characteristics of the resulting sorbent. In the experimental part of this work, we focus on the preparation of pyrolytic materials based on unmodified leaf biomass of broadleaf plantain (BC) and its Mg-modified analogue (MgBC) by slow pyrolysis. The physicochemical characterization of BC and MgBC confirmed significant morphological and mineralogical differences between the prepared sorbents. By realizing sorption experiments we found that the maximum sorption capacity of MgBC for As is 63 times higher than that of BC. The MgBC sorbent showed 35 % retention of As in the model SPE column. Based on the obtained findings, it is evident that the biochar-based sorbent preparated from Mg-modifies precursor represents an efficient sorbent for anionic forms of analytes.

Key Words: solid-phase extraction, biochar, As, sorption, modification

Úvod

Stanovenie stopových koncentrácií analytov je nevyhnutnou požiadavkou pre viaceré oblasti ľudských aktivít, preto je jedným z hlavných cieľov zelenej analytickej chémie vypracovanie jednoduchých, ekologických, bezpečných, selektívnych a citlivých postupov a metodík pre stanovenie vybraných analytov aj pri veľmi nízkych koncentráciách. Využitie biouhlia ako efektívnej stacionárnej fázy pre separáciu a prekoncentráciu rôznych analytov predstavuje inovatívny prístup predúpravy vzorky [1].

Extrakcia tuhou fázou (SPE) sa využíva na extrakciu analytov z rôznych druhov matríc. Tento spôsob extrakcie je často využívaný najmä vďaka svojej rýchlosti, jednoduchosti, pomerne vysokej efektívnosti a ľahkej automatizovateľnosti procesu. SPE ako separačná metóda je rovnako pomerne málo finančne náročná a umožňuje stanovenie stopových koncentrácií v malom objeme vzorky. Na základe uvedených pozitív SPE veľmi často nahrádza konvenčnú

extrakciu kvapalina-kvapalina. SPE je založená na separácii analytu z kvapalnej vzorky. Kvapalná vzorka predstavuje mobilnú fázu systému, ktorá prechádza cez tuhý adsorbent predstavujúci stacionárnu fázu systému a zložky z kvapalnej fázy sa adsorbujú na povrch adsorbentu. Následne dochádza k elúcii viazaných analytov zo sorbentu do vhodného rozpúšťadla. Analyty musia mať vyššiu afinitu k sorbentu ako ku kvapalnej fáze, z ktorej sú adsorbované [2].

Biouhlie predstavuje porézny uhlíkatý materiál s vysokým stupňom aromatizácie štruktúry, ktorá vzniká termickým rozkladom biomasy rastlinného alebo živočíšneho pôvodu za neprítomnosti kyslíka alebo v prostredí s obmedzeným prístupom kyslíka. Biouhlie obsahuje prevažne C, H a O a v nižších koncentráciách N, S, P, K, Na, Mg, Al, Fe, Ca a Si [3].

Pyrolýza je anaeróbny termochemický proces, ktorého výsledkom je rozklad organickej hmoty na plyn, bioolej a tuhý vedľajší produkt – biouhlie [4]. Napriek neprítomnosti kyslíka môže v priebehu pyrolýzy dôjsť k čiastočnej oxidácií, napr. v dôsledku prirodzeného obsahu kyslíka v biomase [5].

Významnou vlastnosťou biouhlia, ktorá ovplyvňuje jeho aplikáciu ako sorbentu v separačných procesoch analytov je jeho povrchový náboj. Ako dobre vieme pH roztoku, resp. vzorky, výrazne ovplyvňuje povrchový náboj biouhlia. Bod nulového náboja (pH_{PZC}) biouhlia predstavuje pH roztoku, pri ktorom je povrchový náboj biouhlia nulový. Ak máme roztok s $pH > pH_{PZC}$, biouhlie bude záporne nabité a potom viaže na svoj povrch katióny analytov, ako sú napríklad Cu^{2+}, Pd^{2+} alebo Hg^{2+}. Ak naopak máme roztok s $pH < pH_{PZC}$, povrchový náboj biouhlia bude kladný a viaže aniónové formy, ako napríklad $HAsO_4^{2-}$ alebo $HCrO_4^{2-}$. Pri vyššej teplote pyrolýzy sa rovnako znižuje množstvo záporne nabitých funkčných skupín ($-COO^-$, -COH, -OH), čo vedie k zvýšeniu pH_{PZC} [6].

Vlastnosti biouhlia možno modifikovať postupmi predpyrolýznej, ako aj postpyrolýznej úpravy (tzv. modifikácie). Modifikácia biomasy vhodnými fyzikálnymi, ako aj chemickými postupmi sa ukázala ako vhodný nástroj pre dosiahnutie sledovaných charakteristík materiálu výsledného biouhlia [7]. Počas modifikácie biouhlia vplyvom kyselín dochádza k odstráneniu zvyškov popola, nečistôt z povrchu a naviazaniu, resp. kreovaniu, nových karboxylových skupín, vďaka ktorým má výsledný produkt vyššiu afinitu ku katiónom analytov [8]. Modifikácie s použitím oxidačného činidla je možné zrealizovať pomocou peroxidu vodíka (H_2O_2) alebo kyseliny dusičnej (HNO_3) pri nízkych teplotách. Použitím HNO_3 sa znižuje špecifický povrch a objem pórov v dôsledku deštrukcie poréznej štruktúry biouhlia. Sulfurizácia pôsobením SO_2 alebo H_2S môže mať tiež deštruktívny vplyv na pórovitosť, ale môže napríklad výrazne zvýšiť sorpčnú kapacitu pre Hg. Nitrogenácia alebo modifikácia dusíkom sa uskutočňuje najmä úpravou biouhlia amoniakom (NH_3) v plynnom stave a využíva sa na dosiahnutie zvýšenia polarity a zásaditosti s cieľom zvýšiť sorpčnú kapacitu, ale aj katalytické vlastnosti pyrolýznych materiálov [5]. Významnú úlohu pri modifikácii biouhlia resp. jeho prekurzora predstavuje vytvorenie vhodných minerálnych kompozitov, ktoré môžu slúžiť ako aktívne sorpčné miesta pre oxoanióny, ktorých sorpčná separácia v prípade nemodifikovaných materiálov je zanedbateľná. Na základe uvedeného bol hlavný zámer práce overenie účinnosti Mg-predpyrolýznej modifikácie vstupného prekurzora na zvýšenie sorpčnej účinnosti pripraveného biouhlia pre AsO_4^{3-} oxoanióny.

1 Materiály a metódy

V tejto kapitole si popíšeme použité metódy, ktoré nám pomohli pri dosiahnutí výsledkov práce.

1.1 Príprava sorbentov na báze biouhlia

Pre produkciu biouhlia bola využitá ako vstupný prekurzor biomasa listov pálky širokolistej (*Typha latifolia*) zozbieraná vo vodohospodárskom obvode Južnej Floridy. Rastlinná biomasa bola následne premytá v deionizovanej vode, nasekaná na približne rovnaké rozmery a vysušená po dobu 7 dní. Následne bola biomasa rozdelená na dva podiely, pričom prvý podiel bol podrobený chemickej modifikácii s roztokom 1,5 mol/L $MgCl_2$ v pomere 1:10 (biomasa : modifikačné činidlo). Pripravený nemodifikovaný, ako aj Mg-modifikovaný vstupný prekurzor, boli podrobené procesu pomalej pyrolýzy pri analogických podmienkach, a to teplote pyrolýzy 500°C, dobe zdržania biomasy v reaktore 60 min a zabezpečení anoxickej atmosféry plynným N_2 vo vsádzkovom pyrolýznom reaktore. Pripravené pyrolýzne produkty na báze nemodifikovanej biomasy (BC) a Mg-modifikovanej biomasy pálky širokolistej (MgBC) boli rozdrvené a s použitím normovaných sít bola získaná frakcia 0,25-1 mm, ktorá bola následne zbavená zvyškovej vlhkosti sušením pri 50°C počas 24 h.

1.2 Fyzikálno-chemická charakterizácia

BC a MgBC boli podrobené fyzikálno-chemickej charakterizácii, a to stanoveniu pH, celkového C a N, špecifického povrchu (SSA) a objemu mikropórov. Pre

sledovanie morfológie a zloženia povrchov boli využité skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM) JEOL JSM-7600F (Tokio, Japonsko), energo-disperzná röntgenová spektroskopia (EDX) pomocou spektrometra Oxford Instruments X-max 50 ako aj röntgenová difrakčná analýza (XRD), ktorá sa vykonala pomocou difraktometra Philips PW 1830 (Philips N.V., Amsterdam, Holandsko).

1.3 Sorpčné experimenty

Pre opísanie sorpčných vlastností BC a MgBC (kinetika sorpcie, vplyv počiatočnej koncentrácie sorbátu, vplyv pH, kompetícia) bol ako modelový aniónový sorbát študovaný AsO_4^{3-} vo vodnom roztoku. Koncentrácie sorbovaného As boli charakterizované na základe stanovenia zvyškovej koncentrácie As v supernatante po danom sorpčnom experimente pomocou elektrochemického prietokového analyzátora EcaFlow 150 GLP (ISTRAN, Slovensko) s využitím zlatej E-T/Au pracovnej elektródy.

1.4 Aplikovateľnosť sorbentov ako náplne SPE kolónky

Pre potvrdenie využiteľnosti MgBC ako náplne SPE kolónky sme použili modelovú kolónku s celkovým objemom 25 ml naplnenú sorbentom ukotveným sklenou vatou. Zachytený eluát bol podrobený stanoveniu As elektrochemickým analyzátorom ako v predchádzajúcom prípade.

2 Výsledky a diskusia

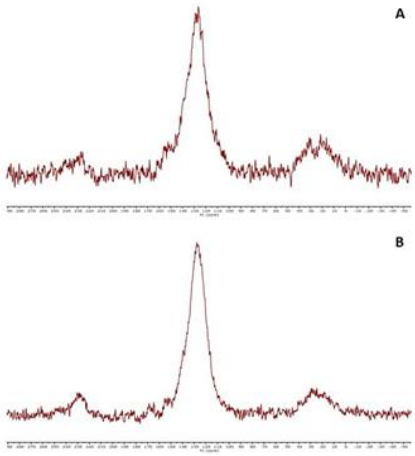
Základné fyzikálno-chemické vlastnosti pripravených sorbentov uvádzame v Tab. 1.

Tab. 1: Základné fyzikálno-chemické charakteristiky BC a MgBC (upravené podľa Polťáková, 2022) [10]

	BC	MgBC
pH	8,21 ± 0,5	9,85± 0,5
C (%)	69,97*	58,93*
N (%)	1,61*	2,27*
SSA (m^2/g)	282,4*	256,9*
$V_{mikropóry}$ (mL/g)	0,100*	0,092*
As (µg/g)	<0,05	<0,05
PO_4^{3-} (µg/g)	50,0 ± 0,5	3,8 ± 0,7
NO_3^- (µg/g)	1,3 ± 0,2	2,8 ± 0,2
NH_4^+ (µg/g)	6,2 ± 0,2	9,0 ± 0,8

* meranie reprezentatívneho podielu v jednom opakovaní

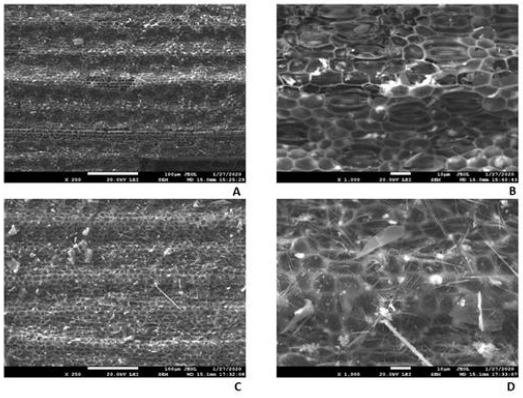
Aktívne pH pre sorbent na báze MgBC mal vyššiu hodnotu pH (9,85) oproti BC (8,21). Autori v práci Jindo a kol. [9] stanovili podobné hodnoty aktívneho pH nemodifikovaného biouhlia na báze ryžovej slamy, resp. dubovej drevnej štiepky. Vyšší alkalický charakter MgBC vyplýva z predpyrolýznej úpravy vstupného prekurzora listov pálky širokolistej v roztoku $MgCl_2$ a následnej termochemickej konverzie zrealizovanej pri 500°C. Elementárna analýza BC a MgBC potvrdila vyšší obsah celkového C pri nemodifikovanom biouhlí (69,97 %) ako pri Mg-modifikovanom biouhlí (58,93 %). Celkové množstvo N bolo pri vzorke BC 1,61 % a pri MgBC 2,27 %. V práci Saleh a kol. [11] pri Mg-modifikácii vstupnej biomasy autori potvrdili obdobný trend v poklese celkového N v modifikovanom produkte pyrolýzy v porovnaní s nemodifikovaným biouhlím. Stanovenie plochy povrchov pomocou CO_2 adsorpcie materiálmi BC a MgBC následnou aplikáciou matematických adsorpčných modelov poukázali na pokles hodnoty SSA z 282,4 m^2/g pre BC na 256,9 m^2/g MgBC ako následok impregnácie biomasy Mg. Pokles SSA sa prejavil aj pri stanovení objemu mikropórov. Ako je zrejmé zo stanovených parametrov Mg-modifikácia biomasy listov pálky širokolistej s následnou pyrolýzou viedla k uzavretiu niektorých štruktúr rastlinných pletív a tým blokovaniu formujúcej sa porozity. Celkový objem mikropórov bol pri BC 0,100 mL/g a pri MgBC 0,092 mL/g.



Obr. 1 ^{13}C-NMR spektrá BC (A) a MgBC (B)

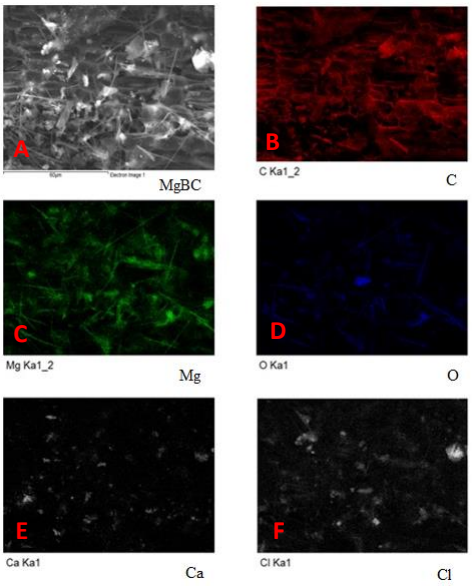
Výsledky ^{13}C nukleárnej magnetickej rezonančnej spektroskopie (Obr. 1) potvrdili veľmi porovnateľný charakter uhlíkových materiálov BC a MgBC. Získané spektrá vykazujú charakteristický pík s vysokou intenzitou v oblasti chemického posunu okolo δ =130 ppm, ktorý je typický pre prítomnosť uhlíka viazaného v aromatických štruktúrach.

Skenovacia elektrónová mikroskopia BC a MgBC pri zväčšení 250× (Obr. 2 A,C) a 1000× (Obr. 2 B,D) potvrdila porézny charakter oboch vzoriek. V prípade MgBC je charakteristická prítomnosť ihlicových kryštalických štruktúr, ktoré nám predikujú formovanie minerálnych kompozitov Mg na povrchoch modifikovaného biouhlia.



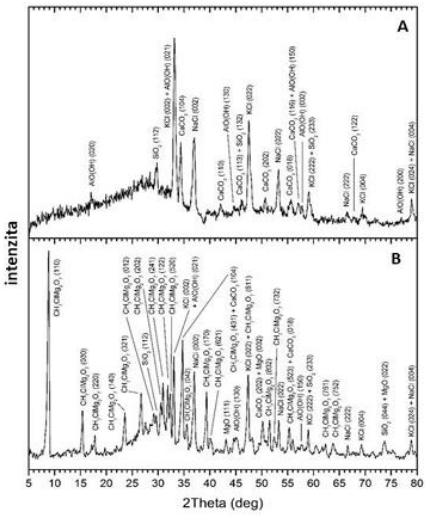
Obr. 2 SEM snímky BC (A, B) a MgBC (C, D) pri zväčšení 250x a 1000x

Práve pre tento účel sme zvolili aj zaradenie energo-disperznej röntgenovej analýzy (EDX), ktorá nám potvrdzuje nielen efektivitu pyrolýzy (Obr. 3 A,B), ale aj samotnej Mg-modifikácie (Obr. 3 C,D,F) s formovaním kľúčových chemických foriem horčíka na povrchu MgBC sorbentu. Prvkové mapovanie poodhalilo kreovanie kompozitov Mg s Cl, O, H, C.



Obr. 3 EDX analýza povrchu MgBC (A) s prvkovým mapovaním C (B), Mg (C), O (D), Ca (E) a Cl (F)

Röntgenová difrakčná analýza vzoriek BC a MgBC (Obr. 4 A,B) potvrdila účinnosť Mg-chemickej modifikácie vstupného prekurzora a kreovanie nových chemických foriem Mg v pyrolýznom produkte MgBC (Obr. 4 B). Pík pri 2θ = 29,5 sa pripisuje na základe porovnania dátových súborov s databázou hexagonálnej štruktúre kalcitu ($CaCO_3$), ktorého intenzita sa pri vzorke MgBC (Obr. 4 B) znížila v dôsledku kreovania nových kompozitov $CaCO_3$ + $CH_7ClMg_2O_7$ teda kalcitu a chlorartinitu ($Mg_2(CO_3)Cl(OH)\cdot 3H_2O$) ako majoritnej minerálnej forme prítomného Mg v štruktúre MgBC. Chlorartinit, ako chemická forma vznikajúca pri nižších teplotách pyrolýzy (400-500°C), bola potvrdená rovnako ako prechodná forma Mg pri pyrolýze Mg-modifikovanej bukovej drevnej štiepky v rozmedzí teplôt 350-700°C [7].

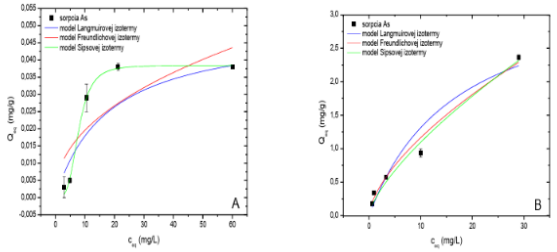


Obr. 4 XRD difrakčné spektrá BC (A) a MgBC (B)

Sorpčným experimentom zameraným na vplyv koncentrácie As na sorpčnú kapacitu sorbentov BC a MgBC získané hodnoty potvrdili len minimálnu sorpciu As sorbentom BC (Obr.5 A). V prípade oboch sorbentov boli sorpčné dáta najlepšie opísateľné Sipsovou adsorpčnou izotermou. Maximálna experimentálna hodnota Q_{eq} As pre MgBC bola v rozmedzí 2,25-2,5 mg/g, čo predstavuje signifikantný rozdiel oproti maximálnej experimentálnej hodnote Q_{eq} pre BC s hodnotou 0,0375 mg/g.

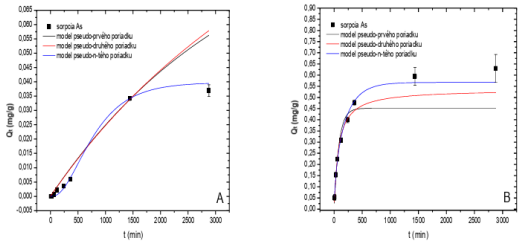
Pre určenie závislosti sorpčnej kapacity BC a MgBC pre As od kontaktného času medzi sorbentom a sorbátom sme využili roztok As s koncentráciou 10 mg/L a s časom kontaktu v intervale 5 – 2880 minút.

Sorpčný proces As v prípade oboch sorbentov najlepšie popisuje kinetický model pseudo-n-tého poriadku.



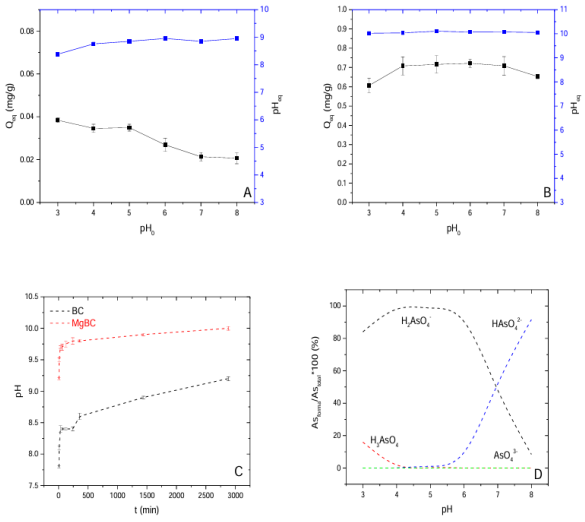
Obr. 5 Experimentálne údaje rovnovážneho sorpčného procesu As sorbentmi na báze BC (A) a MgBC (B) opísané modelmi Langmuirovej, Freundlichovej a Sipsovej adsorpčnej izotermi

Z experimentálnych výsledkov vyplýva, že optimálny čas kontaktu s dosiahnutím saturácie sorbentu sorbátom je 24 h. Z uvedeného dôvodu sme tento čas využívali aj v ďalších experimentoch. Sorpcia As sorbentom na báze MgBC prebieha v dvoch krokoch. V úvode dominuje pomerne rýchla počiatočná fáza, ktorá trvá 6 hodín. Počas tohto časového intervalu dôjde k obsadeniu maximálneho počtu väzbových miest. V rámci druhej pomalšej a kvantitatívne menej významnej fáze dochádza k saturovaniu sorbentu iónmi arzénu. Xia a kol. [13] vo svojej práci uviedli, že s predlžovaním času sorpcie sa percento odstráneného As sorbentami na báze biouhlia pripraveného z banánových šupiek, ovocných kôstok a rezíduí po produkcii bioplynu zvyšuje.



Obr. 6 Kinetika sorpcie As sorbentami na báze BC (A) a MgBC (B)

Na sorpčný proces As sme použili roztok As s koncentráciou 10 mg/L, ktorého pH bolo v intervale od 3 – 8 a s časom kontaktu 24 h. Zo zistených experimentálnych výsledkov sme zistili vplyv počiatočného pH systému na rovnovážne množstvo sorbovaného As sorbentami BC a MgBC (Obr. 7 A, B) a zmenu pH v čase (Obr. 7 C). Pozorovaním vplyvu pH na rovnovážne množstvo sorbovaného As sme zistili, že pri sorbente BC so stúpajúcou hodnotou počiatočného pH hodnota Q_{eq} klesala a pri MgBC zostávala približne rovnaká. Minimálna zmena nastala v intervale pH 3 – 4 kedy Q_{eq} mierne stúpla, ustálila sa a následne pri pH 7 mala klesajúci trend. Z týchto výsledkov vyplýva, že optimálne pH pre sorpciu As je v intervale 5 – 6. Yan a kol. [12], ktorí využívali biouhlie modifikované $ZnCl_2$ dospeli k záverom, že so zvyšujúcim sa pH sorpčná kapacity klesá. Lata a kol. [14] to zdôvodnili, že zmenou pH sa zmenil povrchový náboj biouhlia na negatívny, čo spôsobilo odpudzovanie povrchu biouhlia so sorbátom. Kinetický priebeh zmeny pH (Obr. 7 C) potvrdil, že pri sorpcii As sorbentom BC stúplo pH z počiatočnej hodnoty 5,8 na hodnotu 8 už po 30 minútach. Po 60 minútach sa zmena pH spomalila a na konci experimentu, po 48 h, mala hodnotu 9,2. Pri MgBC bola táto zmena rýchlejšia, pretože už po 5 minútach pH stúplo na 9,2 a hodnota na konci experimentu bola 10. *In silico* špeciačná analýza zrealizovaná pomocou programu Visual MINTEQ (verzia 3.01), ktorá vychádza z hodnôt konštánt stability komplexov *log K* a z termodynamických charakteristík dHr za definovaných podmienok prostredia (Obr. 7 D) nám potvrdila, že pri našich experimentálnych podmienkach sa As pri pH 3 vo vodnom roztoku vyskytuje vo forme H_3AsO_4 (18 %) a $H_2AsO_4^-$ (82 %).

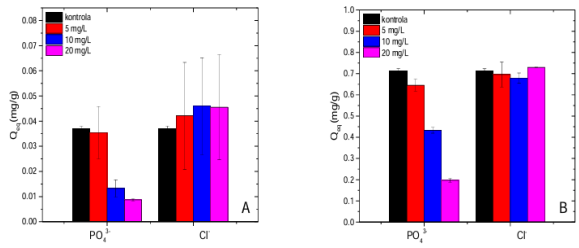


Obr. 7 Závislosť As-sorpčenej kapacity pre BC (A) a MgBC (B) a rovnovážneho pH od počiatočnej hodnoty pH. Vplyv kontaktného času (C), *in silico* špeciačná analýza As (D)

Koncentrácia H_3AsO_4 klesá zo stúpajúcou hodnotou pH. Pri pH 4 sa začína objavovať disociovaná forma $HAsO_4^{2-}$, ktorá sa stáva so stúpajúcou hodnotou pH

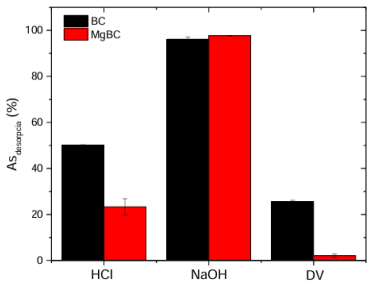
dominantnou. Disociovaná forma $H_2AsO_4^-$, ktorá bola pri pH 3 dominantná, dosahovala pri pH 4 – 6 takmer 100 %, ale po prekročení pH 6 jej obsah v roztoku začal klesať a už pri hodnote pH 8 predstavovala menej ako 10 % celkového obsahu As v roztoku. Podľa týchto skutočností sme zistili, že roztok As na začiatku experimentu obsahoval As v majoritnej forme $H_2AsO_4^-$. Keďže sa pH rýchlo zvyšovalo, už po krátkej dobe bola dominantná disociovaná forma $HAsO_4^{2-}$.

Na sledovanie vplyvu kompetície (súperenia) iných iónov na sorpčný proces As (10 mg/L) sme využili roztoky iónov PO_4^{3-} a Cl^- v koncentrácii 5, 10 a 20 mg/L. Zo získaných experimentálnych údajov o sorpčnej kapacite BC a MgBC sme zistili, že PO_4^{3-} mal zásadný vplyv na sorpciu As pri oboch sorbentoch a všetkých skúmaných koncentráciách. Na základe našich experimentálnych dát usudzujeme, že ióny PO_4^{3-} výrazne ovplyvňujú sorpciu As a so zvyšujúcou sa koncentráciou tento vplyv stúpa pri oboch sorbentoch. Je zrejmé, že fosfor ako chemický analóg As sa vo vodných roztokoch správa podobne. Naopak ióny Cl^- nemali ani pri zvyšujúcej sa koncentrácii významný vplyv na sorpciu As oboma typmi sorbentov na báze BC a MgBC (Obr.8 A,B).



Obr. 8 Kompetitívny vplyv PO_4^{3-} a Cl^- na sorpčný proces As sorbentami BC (A) a MgBC (B).

Pre potvrdenie regenerovateľnosti sorbentov (Obr. 9) na báze BC a MgBC sme ako desorpčné činidlá študovali roztoky HCl, NaOH a deionizovanú vodu.



Obr. 9 Regenerácia sorbentov BC (A) a MgBC (B)

Z Obr. 9 je zrejmé, že desorpčným činidlom s najvyššou účinnosťou pre oba skúmané sorbenty bol 0,1 mol/L NaOH. Účinnosť desorpcie As pri NaOH dosahovala pre oba sorbenty hodnotu viac ako 95 % viazaného As. Pri použití 0,1 mol/L HCl ako desorpčného činidla bola účinnosť desorpcie pre BC 50 % a pre MgBC 20 %. Ako najmenej efektívne desorpčné činidlo sa v prípade oboch sorbentov ukázala deionizovaná voda, kedy hodnoty účinnosti boli pre BC 20 % a pre MgBC približne 2 %. Obdobnú účinnosť alkalickej desorpcie As viazaného na biouhlie vo svojej práci uvádza Niazi a kol. [15].

Na záverečné overenie aplikovateľnosti MgBC ako potenciálnej náplne SPE kolónky pre separáciu As z vodného roztoku sme použili 0,5 g sorbentu, ktorý bol ukotvený medzi dvoma vrstvami sklenej vaty. Keďže z predchádzajúcich výsledkov sme zistili, že sorbent na báze BC sa ukazuje ako menej efektívny pre separáciu a prekoncentráciu As z vodných roztokov, jeho aplikovateľnosť sme v tomto experimente neskúmali. Získané výsledky preukázali retenciu As kolónkou naplnenou sorbentom MgBC pri prietoku 0,12 mL/s a daných experimentálnych podmienkach 35 ± 2 %. Vyššiu účinnosť bude možné dosiahnuť pri znížení rýchlosti prietoku vzorky cez kolónku. Táto skutočnosť potvrdzuje efektívnosť použitia skúmaného materiálu ako SPE náplne, resp. sorbentu pre As-prekoncentračné a extrakčné postupy.

Záver

Aplikácia tuhých pyrolýznych produktov (biouhlia) ako sorbentov v prekoncentračných, resp. extrakčných postupoch a metódach predúpravy vzorky, predstavuje pomerne inovatívny prístup vo využívaní týchto materiálov v neagrárnych smerovaniach. Sorbenty na báze modifikovaného (MgBC), ale aj nemodifikovaného biouhlia (BC) boli podrobené fyzikálno-chemickej charakterizácii, ktorá poodhalila významné rozdiely v elementárnej, mineralogickej, ale aj štruktúrnej kompozícii a morfológii povrchov. Oba materiály boli testované vo vsádzkovom usporiadaní sorpčných experimentov ako efektívne sorbenty pre separáciu As z vodných roztokov. Získané výsledky potvrdili, že MgBC vykazuje 63-násobne vyššiu sorpčnú kapacitu Q_{eq} pre As v porovnaní s BC. Sorpčný proces As sorbentmi na báze BC a MgBC predstavuje pH a časovo závislý proces s optimálnou hodnotou pH 5 – 6 a kontaktným časom 24 h. Sorpčná kapacita MgBC je závislá na prítomnosti fosforečnanových aniónov v roztoku, ktoré eliminujú sorpciu As. Sorbenty BC aj MgBC sa ukázali

ako dobre regenerovateľné pomocou 0,1 mol/L NaOH ako desorpčného činidla (účinnosť > ako 95 %). MgBC sa ukázal ako rovnako účinná stacionárna náplň SPE kolónky s retenciou As 35 ±2 %. Zo získaných výsledkov vyplýva, že pyrolýzne produkty s vhodne zvolenou modifikáciou dokážu konkurovať konvenčným stacionárnym fázam v prekoncentračných, resp. purifikačných kolónach.

Poďakovanie

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0399/24.

Použitá literatúra

[1] AUGUSTO, F. et al. 2013. New materials and trends in sorbent for solid-phase extraction. In *Trends in Analytical Chemistry.* ISSN: 0165 – 9936, 2013, vol. 43, 14 – 23

[2] PŁOTKA-WASYLKA, J. et al. 2016. Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. In *Trends in Analytical Chemistry*. ISSN: 0165 – 9936, 2016, vol. 77, 23 – 43

[3] AMALINA, F et al. 2022. Advanced techniques in the production of biochar from lignocellulose biomass and environmental applications. In *Cleaner Materials*. ISSN: 2772 – 3976, 2022, vol. 6

[4] BOLAN, N. et al. 2022. Multifunctional application of biochar beyond carbon storage. In *International materials reviews*. ISSN: 0950 – 6608, 2022, vol. 67, 150 – 200

[5] HAGEMANN, N. 2018. Activated carbon, biochar and charcoal: Linkages and sinergies across pyrogenic carbon´s ABCs. In *Water*. ISSN: 2073 – 4441, 2018, vol. 10

[6] LI, H. et al. 2017. Mechanisms of metal sorption by biochars: Biochar characteristics and modifications. In *Chemosphere*. ISSN: 0045 – 6535, vol. 178, 466 – 478

[7] DIEGUEZ-ALONSO, A. et al. 2019. Designing biochar properties through the blending of biomass feedstock with: Impact on oxyanions adsorption behavior. In *Chemosphere*, ISSN: 0045 – 6535, 2019, vol. 214, 743 – 753

[8] BENIS, Z . et al. 2020. Treatment oa aqueous arsenic – A review of biosorbent preparation methods. In *Journal of Environmental Mamagement*. ISSN: 0301 – 4797, 2020, vol. 273

[9] JINDO, K et al. 2014. Physical and chemical characterization of biochar derived from different agricultural residues. In *Biogeosciences*. ISSN: 1726 – 4184, 2014, vol. 11, 6613 – 6621

[10] POLŤÁKOVÁ, L. 2022 Biouhlie ako nástroj pre zmiernenie dopadov klimatických zmien. [Bakalárska práca]. Trnavská univerzita v Trnave. Pedagogická fakulta, 66 s.

[11] SALEH, M. E et al. 2018. Mg-modified sugarcane bagasse biochar for dual removal of ammonium and phosphate ions from aqueous solutions. In *Alexandria Science Exchange Journal*. ISSN: 2536 – 9784, 2018, vol. 39, 74 – 91

[12] YAN, J et al. 2018. Adsorption removal of As (V) by crawfish shell biochar: batch and column test. In *Environmental Science and Pollution Research International*. ISSN: 0944 – 1344, 2018, vol. 25

[13] XIA, D. et al. 2016. ZnCl2 – activated biochar from biogas residue facilitates aqueous As (III) removal. In *Applied Surface Science*. ISSN: 0169 – 4332, 2016, vol. 377, 361 – 369

[14] LATA, S et al. 2019. As (V) removal using biochar produced from an agricultural waste and prediction of removal efficiency using multiple regression analysis. In *Environmental Science and Pollution Research International*. ISSN: 0944 – 1344, 2019, vol. 26

[15] NIAZI, N. K. et al. 2018. Arsenic removal by Japanese oak wood biochar in aqueous solutions and well water: Investigating arsenic fate using integrated spectroscopic and microscopic techniques. In *The Science of the Total Environment*. ISSN: 0048 – 9697, 2018, vol. 621, 1642 - 1651

Vývoj a syntéza nových typov fotosenzibilátorov s medicínskym aplikačným potenciálom

Design and synthesis of new photosensitizers with medicinal application potential

Dominika Kendrová[1]
Školiteľ: Zita Tokárová[1]
[1]Ústav chémie a environmentálnych vied, Oddelenie chémie FPV UCM, Námestie Jozefa Herdu 2, 917 01 Trnava
kendrova1@ucm.sk, zita.tokarova@ucm.sk

Abstrakt
Fotodynamická terapia (PDT) neustále vzbudzuje pozornosť ako moderná terapeutická metóda zneškodňovania nádorových ochorení diagnostikovaných v takej oblasti tela, ktorá je zároveň ľahko ožarovateľná v oblasti UV-Vis (koža, prsníky, prostata). Veľké využitie našla neterapeutická odvetva PDT v oblasti kozmetiky a estetickej medicíny predovšetkým v krajinách bývalej Ruskej federácie.

V našich výskumoch sa však sústredíme predovšetkým na využiteľnosť organických fotosenzibilátorov (PS) ako kľúčových a aktívnych súčastí v konkrétnej medicínskej aplikácii. Teoretická časť prezentovanej práce je preto zameraná na prehľad a vývoj fotosenzibilátorov reálne využívaných vo fotodynamickej terapii. Ďalej sa prezentuje mechanizmus účinku fotosenzibilátorov v PDT a podobnosť PS s organickými polovodičmi. Taktiež sa venujeme problematike prípravy nanočastíc, ktoré jediné zaistia transport fotosenzibilátora na miesto účinku bez poškodenia zdravých buniek/tkanív.

Experimentálna časť sa zaoberá dizajnom a syntézou PS a to pre dva 2 typy derivátov : *i)* s obsahom tiofénového jadra alebo *ii)* s obsahom funkčného substituenta. Dôležitú časť tvorí syntéza nesymetrických ftalokyanínov, ktoré obsahujú ľahko modifikovateľné funkčné skupiny, ktoré sú prekurzorom prípravy nanočastíc (NPs). Táto časť je syntetická, avšak nezasahuje úplne do oblasti samotnej PDT, pretože sa sústredíme na modifikáciu reakčných podmienok v prospech vzniku PS-derivátov s očakávanou štruktúrou.

Kľúčové slová: fotodynamická terapia (PDT), fotosenzibilátor (PS), organická syntéza, spektrálne metódy, nanočastice (NPs)

Abstract
Photodynamic therapy (PDT) is constantly attracting attention as a modern therapeutic method of destroying cancer diagnosed in an area of the body that is also easily irradiated in the UV-Vis area (skin, breasts, prostate). The non-therapeutic branch of PDT has found great use in the field of cosmetics and aesthetic medicine, especially in the countries of the former Russian Federation.

In our research, however, we will focus primarily on the usability of organic photosensitizers (PS) as key and active components in a specific medical application. The theoretical part of the presented work is therefore focused on the overview and development of photosensitizers actually used in photodynamic therapy. Next, the mechanism of action of photosensitizers in PDT and the similarity of PS with organic semiconductors are presented. We also deal with the issue of preparing nanoparticles, which alone ensure the transport of the photosensitizer to the site of action without damaging healthy cells/tissues.

The experimental part deals with the design and synthesis of PS for two 2 types of derivatives: *i)* containing a thiophene core or *ii)* containing a functional substituent. An important part is the synthesis of unsymmetrical phthalocyanines, which contain easily modifiable functional groups, which are a precursor to the preparation of nanoparticles (NPs). This part is synthetic, but it does not extend completely into the area of PDT itself, because we focus on the modification of the reaction conditions in favor of the formation of PS-derivatives with the expected structure.

Key Words: photodynamic therapy (PDT), photosensitizer (PS), organic synthesis, nanoparticles (NPs)

Úvod

Fotodynamická terapia je paradoxne založená na účinku reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré všeobecne nie je žiadúce a dlhodobým vplyvom ROS sa prejavuje oxidačný stres. V kombinácii so žiarením a účinkom PS iba v mieste existencie malignych buniek dochádza k apoptóze bez zásahu do zdravého tkanikva. Princíp účinku je striktne fyzikálny pretože je to fotochemický proces pre ktorý je nevyhnutná fluorescencia PS. Fluorescencia je jav, pri ktorom dochádza k excitácii elektrónov zo základného singletového stavu S^0 do excitovaného singletového stavu S^1, avšak proces excitácie pokračuje až na excitovaný tripletový stav T^1. Do základného singletového stavu S^0 sa vracia generovaním ROS prostredníctvom 2 mechanizmov (*typ I* a *typ II*) [1].

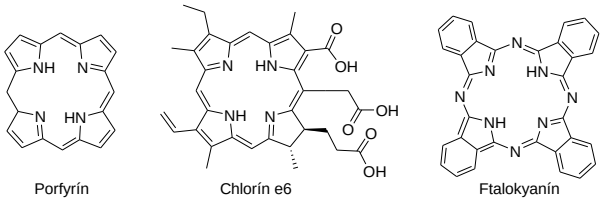
Práve tento jav je založený na rovnakom fyzikálno-chemickom princípe, ako je premena Vis-radiácie na prúd elektrónov v organických polovodičoch [2].

1 Teoretická časť

V tejto časti si vysvetlíme základné pojmy, ktoré sme si potrebovali objasniť pri spracovaní výskumu.

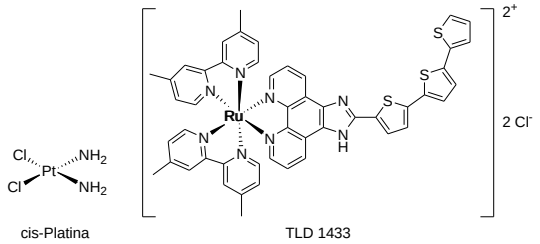
1.1 Vývoj fotosenzibilátorov pre fotodynamickú terapiu

PS možno rozdeliť na 2 hlavné skupiny, a to: *i)* na nekoordinované PS, ktoré sú na báze organických zlúčenín pri ktorých sa nevyžaduje potreba koordinácie. Medzi takéto PS možno zahrnúť porfyrín, ftalokyanín alebo chlorín e6. Práve nekoordinovaný PS bol prvým schváleným typom PS s využitím pre klinické aplikácie [3].



Obr. 1 Chemická štruktúra vybraných nekoordinovaných fotosenzibilátorov - porfyrín, chlorín e6, ftalokyanín.

A *ii)* na koordinované PS, ktoré obsahujú organickú zložku v podobe ligandu. Tieto sú aktuálne študované vďaka ich jednoduchej syntéze a ľahkej modifikácii. Typickými príkladmi koordinovaných PS sú komplexy na báze Ru(II) a Pt(II). Ako napríklad *cis*-platina alebo TLD 1433, ktorú zároveň považujeme za našu „leading structure“ [3].

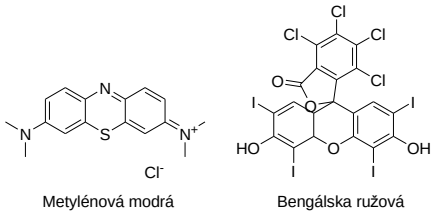


Obr. 2 Chemická štruktúra vybraných koordinovaných fotosenzibilátorov – *cis*-platina a TLD 1433.

1.2 Príbuzné odvetvia fototerapie

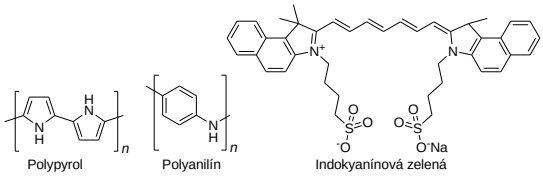
Vo všeobecnosti možno fototerapiu rozdeliť do troch kategórií, a to na:

i. *Fotodynamickú terapiu*, ktorá sa zakladá na existencii kyslíka, žiarenia a netoxického PS, ktorý zohráva dôležitú úlohu. Bežne používanými PS v PDT sú fenantiazínové farbivá, ktorým je napríklad metylénová modrá; ftalokyaníny, porfyríny alebo xantény, ktorým je bengáska ružová [4, 5].



Obr. 3 Chemická štruktúra fotosenzibilátorov využívaných v PDT – metylénová modrá a bengálska ružová.

ii. *Fototermálnu terapiu* (PTT), ktorá spočíva vo využití elektromagnetického žiarenia na liečbu nádorov. Táto metóda sa vyznačuje vysokou časovou a priestrovou selektivitou a nízkou invazívnosťou. Typickými PS využívanými v PTT sú organické polyméry a indokyanínová zelená [4].



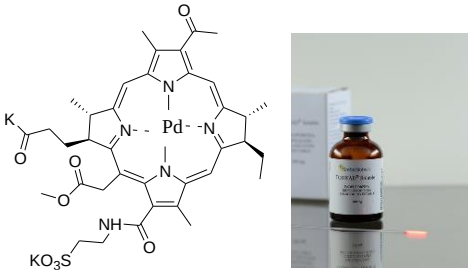
Obr. 4 Chemická štruktúra fotosenzibilátorov využívaných v PTT – polypyrol, polyanilín, indokyanínová zelená.

iii. *Fotokatalytická terapia*, ktorá predstavuje proces, pri ktorom sa k rozkladu chemických látok využíva svetelená energia a následnou absorpciou žiarenia vzniká excitovaný elektrón. Ako PS sa tu využívajú kovalentné organické štruktúry alebo grafitický nitrid uhlíka [4, 6].

1.4 Predklinické štúdie a klinicky využívané liečivá

Vzhľadom na fakt, že každým rokom sa hranica ľudí trpiacimi nádorovými ochoreniami neustále zvyšuje, je nutné pracovať na včasnom odhalení choroby a na neustálom vývoje nových metódach liečby a liečiv [7].

V súčasnosti sú známe niektoré klinicky využívané liečivá, akými sú v Európe napríklad bengálska ružová využívaná k liečbe rakoviny hrtana a TOOKAD®, ktorý sa využíva na liečbu rakoviny prostaty [7, 8].



Obr. 5 Chemická štruktúra fotosenzibilátora TOOKAD® a roztok na intravenózne podanie.

V Rusku patria medzi takéto liečivá, napríklad Radachlorin®, na liečbu rakoviny kože alebo Photosense využívaný v očnom lekárstve [9, 10].

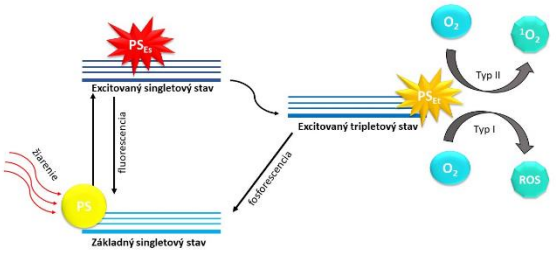


Obr. 6 Chemická štruktúra fotosenzibilátora Radachlorin® a 0,35 % 10 ml roztok na intravenózne podanie.

Najznámejším liečivom je TLD 1433, ktoré bolo v Kanade schválené na klinické použitie pri liečbe rakoviny močového mechúra [11].

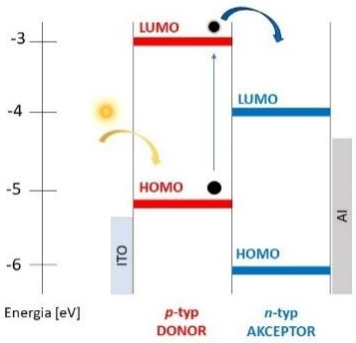
1.5 Podobnosť fotosenzibilátorov s organickými polovodičmi

Pri využití PS *I.* alebo *II.* mechanizmom PDT dochádza vplyvom fotochemickej reakcie k tvorbe reaktívnych foriem kyslíka a k poškodeniu buniek [12].



Obr.7 Mechanizmus účinku PDT. Spracované podľa Calixto, G. M. F. et al. [12].

Pri využití organického polovodiča nastáva prúd elektrónov, ako dôsledok e—h^+ (e- = elektrón, h^+ = diera) prechodu na povrchu donor-akceptor rozhrania a akceptora elektrónov [2].



Obr.8 HOMO a LUMO tranzitné stavy. Spracované podľa CHEN, F-CH et al. 2018 [2].

1.6 Nanočastice v PDT

Nanočastice možno charakterizovať ako častice s veľkosťou sub-mikrometrov. Zohrávajú dôležitú úlohu pri potrebe dodania liečiva do miesta nádoru, a to kvôli hydrofóbnosti PS, kedy má zdroj žiarenia slabú penetráciu do tkaniva. NPs sa vyznačujú typickými optickými vlastnosťami využívanými na prenos energie a aktiváciu PS.

2 Materiál a metódy

Tenkovrstvová chromatografia (TLC) využitím silufolových platničiek. Vyhodnotenie prebiehalo pomocou UV lampy pri 254 nm a 366 nm -

Laboratórium organickej syntézy, Ústav chémie a environmentálnych vied, Oddelenie chémie, FPV UCM v Špačinciach. Poďakovanie patrí doc. Mgr. Renáte Gašparovej, PhD.

Magnetická miešačka typu Heidoplph s ohrevom - Laboratórium organickej chémie, Ústav chémie a environmentálnych vied, Oddelenie chémie, FPV UCM v Špačinciach.

Vákuová rotačná odparka Heidoplh - Laboratórium organickej chémie, Ústav chémie a environmentálnych vied, Oddelenie chémie, FPV UCM v Špačinciach.

Teplota topenia syntetizovaných derivátov bola určená syntetizovaných derivátov prístrojom Biobase - Laboratórium organickej chémie, Ústav chémie a environmentálnych vied, Oddelenie chémie, FPV UCM v Špačinciach.

Stĺpcová kolónová chromatografia bola využitá na izoláciu produktov, využitím silikagélu Kiesegel 60 - Laboratórium organickej chémie, Ústav chémie a environmentálnych vied, Oddelenie chémie, FPV UCM v Špačinciach.

Hmotnostná spektroskopia – MALDI-TOF bola realizovaná na pracovisku Chemického ústavu SAV a Úpol SAV.

Nukleárna magnetická rezonancia (NMR) bola realizovaná na pracovisku Ústavu chémie a environmentálnych vied, Oddelenia chémie FPV UCM v Špačinciach a na pracovisku Chemického ústavu SAV a Úpol SAV.

Infračervená spektroskopia bola realizovaná na pracovisku Chemického ústavu SAV a Úpol SAV.

Elementárna analýza bola realizovaná na pracovisku Chemického ústavu SAV a Úpol SAV.

3 Experimentálna časť

Experimentálnu časť možno celkovo zhrnúť do piatich bodov, a to na:

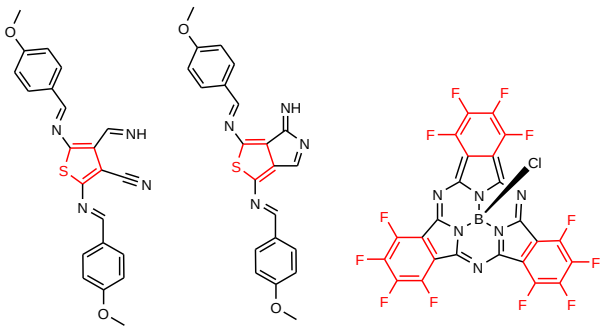
i. syntézu nesymetrických Pc s obsahom tiofénového jadra, ktorá je založená na metóde prekurzoru a izoindolu;
ii. syntézu nesymetrických Pc s obsahom funkčnej skupiny, založenej na miešaní dvoch nitrilov ;
iii. syntézu azometínov a ich následnú cyklizáciu na SubPc;
iv. ďalej prebiehajúcu modifikáciu syntetických postupov, izoláciu produktov a medziproduktov;
v. a identifikáciu chemickej štruktúry syntetizovaných zlúčenín spektrálnymi metódami: azometíny (LF-NMR), ostatné (HF-NMR, IČ, EA, MALDI-TOF).

4 Výsledky a diskusia

V tejto časti si podrobne opíšeme dosiahnuté výsledky, ktoré porovnáme s naším cieľom.

4.1 Cyklizácia na nesymetrické ftalokyaníny s obsahom tiofénového jadra/fluóru

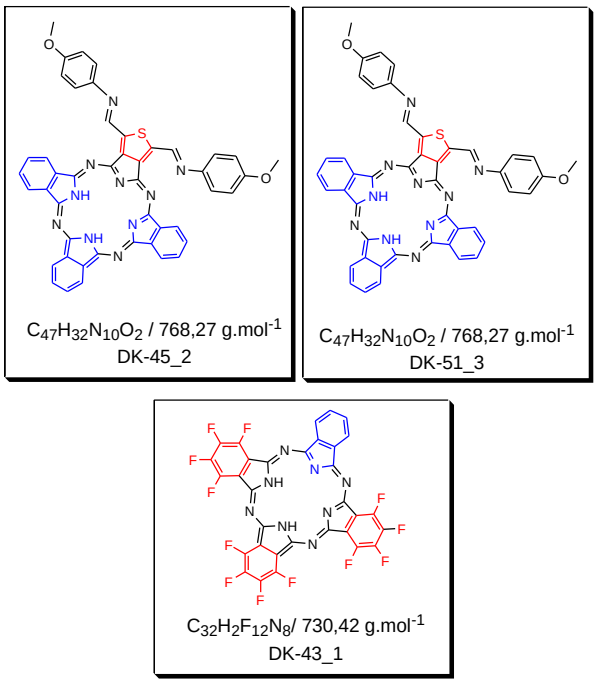
V prípade cyklizácie na nesymetrické ftalokyaníny sme vychádzali so substrátov, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú tiofénové jadro alebo zo subftalokynaínov (tripyrol), ktoré obsahujú atómy fluóru.



Obr.9 Chemická štruktúra substrátov využitých pri cyklizácii na nesymetrické ftalokyaníny s obsahom tiofénového jadra/fluóru.

Ako činidlo sme v každom prípade využívali izoindol-1,3-diimín. Získali sme tri deriváty vo výťažku približne 30 %, získali sme ich pomerne čisté, a tak metóda izolácie prebiehala kryštalizáciou. V súčasnosti prebieha identifikácia štruktúry týchto zlúčenín spektrálnymi metódami.

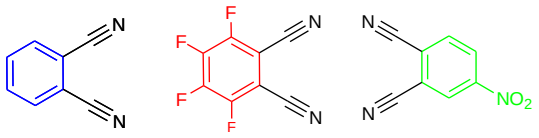
Syntézy boli realizované podľa postupu publikovaného podľa Sastre, Á. et al. [13].



Obr.10 Chemické štruktúry očakávaných derivátov nesymetrických ftalokyanínov s obsahom tiofénového jadra/fluóru.

4.2 Cyklizácia na nesymetrické ftalokyaníny s obsahom funkčnej skupiny

V tomto prípade cyklizácie na nesymetrické ftalokyaníny sme vychádzali zo susbstrátov, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú dusík, a to: ftalonitril , 3,4,5,6-tetrafluóro-ftalonitril a 4-nitroftaloniril.

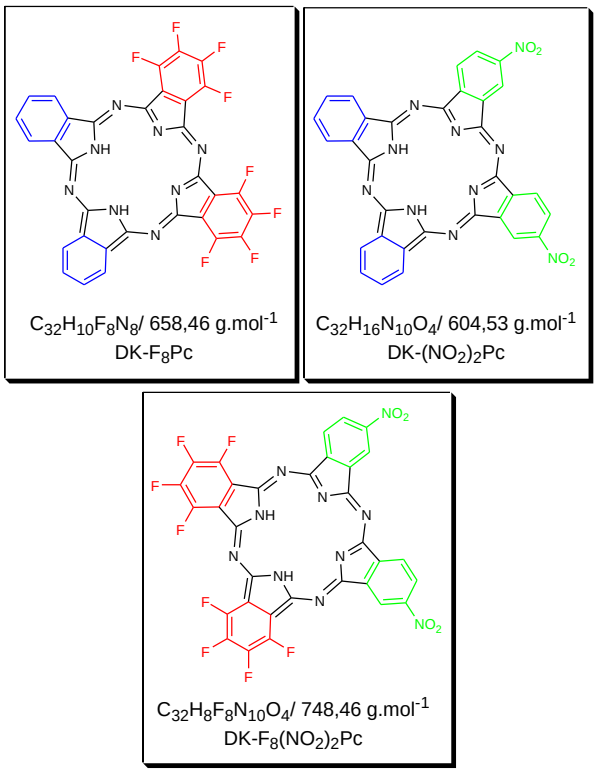


Ftalonitril 3,4,5,6-tetrafluóro-ftalonitril 4-nitroftalonitril

Obr.11 Chemická štruktúra substrátov využitých pri cyklizácii na nesymetrické ftalokyaníny s obsahom funkčnej skupiny.

Získali sme niekoľko derivátov, pričom sme vzhľadom na modifikáciu rekčných podmienok každú reakciu opakovali niekoľkokrát. Deriváty sme však získali znečistené, a tak ich bolo potrebné čistiť využitím stĺpcovej kolónovej chromatografie. V súčasnosti taktiež prebieha identifikácia štruktúry týchto zlúčenín spektrálnymi metódami.

Syntézy boli realizované podľa postupu publikovaného podľa Dilber, G. et al. [14].



Obr.12 Chemické štruktúry očakávaných derivátov nesymetrických ftalokyanínov s obsahom funkčnej skupiny.

4.3 Syntéza azometínov ako substrátov potrebných pre ďalšiu syntézu subftalokyanínov

Syntéza azometínov bola uskutočnená, kvôli potrebe ich využitia ako susbtrátov v ďalšej syntéze subftalokyanínov (SubPc).

Získali sme 3 deriváty s obsahom tiofénu, furánu a salycilaldehydu v pomerne vysokých výťažkoch (25,8 % - 93,33 %). Tieto deriváty sme získali čisté a nebola potreba dodatočného čistenia. Štruktúra týchto zlúčenín bola potvrdená nízkofrekvenčnou NMR na pracovicku Ústavu chémie a environmentálnych vied, Oddelenia chémie, FPV UCM v Špačinciach.

Syntézy boli realizované podľa postupu publikovaného podľa Tokárová, Z. et al. [15].

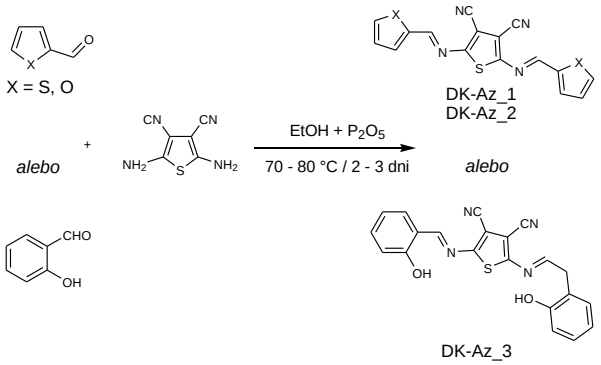


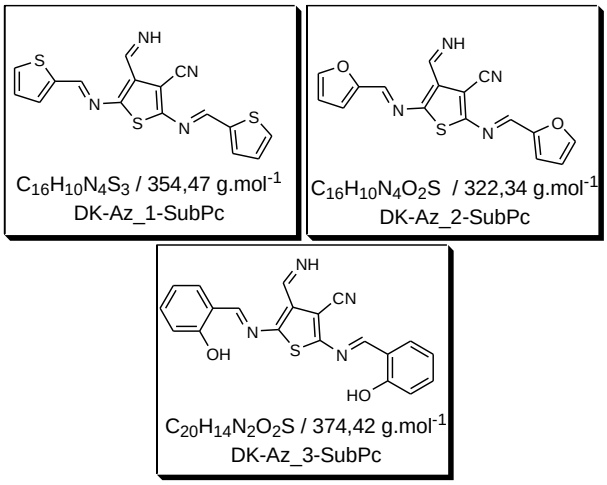
Schéma 1 Všeobecná schéma syntézy azometínov.

4.4 Cyklizácia azometínov na subftalokyaníny

Táto časť je zameraná už na spomínanú cyklizáciu na SubPc. Realizovaná bola predovšetkým na overenie mechanizmu priebehu reakcie z bakalárskej práce.

Získali sme 3 deriváty, ktoré sa dajú očakávať vzhľadom na mechanizmus, akým reakcia prebieha. V tomto pripáde bola taktiež stanovená teplota topenia syntetizovaných zlúčenín, ktorá sa pohybovala v rozsahu 37 – 83 °C.

Aktuálne prebieha identifikácia štruktúry týchto zlúčenín spektrálnymi metódami.



Obr.13 Chemické štruktúry očakávaných derivátov subftalokyanínov.

Záver

V aktuálnej časti výskumu prebieha identifikácia syntetizovaných zlúčenín využitím spektrálnych metód - LF-NMR, HF-NMR, IČ, EA, MALDI-TOF.

Celkovo sme syntetizovali nesymetrické Pc s obsahom tiofénu, ktoré majú analógiu so štruktúrou TLD 1433. Ďalej nesymetrické Pc s obsahom ľahko modifikovateľnej fukčnej skupiny. A na záver azometíny, ktoré nám slúžili na overenie mechanizmu priebehu rekacie z bakalárskej práce.

Poďakovanie

Práca vznikla z finančnou podporou grantovej úlohy VEGA 1/0086/21 a APVV 19/0087.

Touto cestou by som chcela poďakovať svojej školiteľke RNDr. Zite Tokárovej, PhD. za odborné vedenie a užitočné rady.

Použitá literatúra

[1] DĄBROWSKI, J. M. 2017. Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation. In Advances in Inorganic Chemistry, Vol. 70. Burlington: Academic Press, 2017, p. 343 – 394. ISBN 978-0-12-812834-3.

[2] CHEN, F-CH. 2018. Organic Semiconductors. In Encyclopedia of Modern Optics II, Vol. 5. Elsevier: UK. ISBN 978-0-12-803581-8.

[3] CHEN, CH. et al. 2022. Photodynamic-based combinatorial cancer therapy strategies: Tuning the properties of nanoplatform according to oncotherapy needs. In *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 461, no. 214496. ISSN 0010-8545.

[4] RAN, B. et al. 2021. Organic Photo-antimicrobials: Principles, Molecule Design, and Applications. In Journal of the American Chemical Society, vol. 143, no. 43, p. 17891 – 17909. ISSN 3467-7069.

[5] FIGUEIREDO, R. A. et al. 2014. Tooth Discoloration Induced by Endodontic Phenothiazine Dyes in Photodynamic Therapy. In Photomedicine and Laser Surgery, vol. 32, no. 8, p. 458 – 462. ISSN 2504-5801.

[6] FENG, X. et al. 2012. Covalent organic frameworks. In Chemical Society Reviews, vol. 41, no. 18, p. 6010 – 6022. ISSN 1039-3515.

[7] DE SIQUEIRA, L. B. O. et al. 2022. Pharmaceutical nanotechnology applied to phthalocyanines for the promotion of antimicrobial photodynamic therapy: A literature review. In Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, vol. 39, no. 102896. ISSN 1572-1000.

[8] NOWESKI, A. et al. 2019. Medium-term follow-up of Vascular-Targeted Photodynamic therapy (VTP) of localized prostate cancer using TOOKAD®-Soluble WST-11. In European Urology Focus. ISSN 2966-1587.

[9] KOCHNEVA, E. V. et al. 2010. Photosensitizer Radachlorin®: Skin cancer PDT phase II clinical trials. In Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, vol. 7, p. 258 – 267. ISSN 1572-1000.

[10] SMIRNOVA, Z. S. et al. 2005. Efficiency and Pharmacokinetics of Photosense: A New Liposomal Photosensitizer Formulation Based on Aluminum Sulfophthalocyanine. In Pharmaceutical Chemistry Journal, vol. 37, no. 7, p. 341 – 344. ISSN 3907-0341.
[11] McFARLAND, S. A. et al. 2020. Metal-based Photosensitizers for Photodynamic Therapy: The Future of Multimodal Oncology? In Current Opinion in Chemical Biology, vol. 56, p. 23 – 27. ISSN 3175-9225.
[12] CALIXTO, G. M. et al. 2016. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. In Molecules, vol. 21, no. 342. ISSN 2103-0342,
[13] SASTRE, Á. et al. 1996. Synthesis of Novel Unsymmetrically Substituted Push-Pull Phthalocyanines. In The Journal of Organic Chemistry, vol. 61, p. 8591 – 8597. ISSN 0022-3263.
[14] DILBER, G. et al. 2022. Asymmetrically tetra-substituted phthalocyanine derivatives: synthesis, photophysical and photochemical properties. In Transition Metal Chemistry, vol. 47, p. 157 – 168. ISSN 1124-3022.
[15] TOKÁROVÁ, Z. et al. 2020. Thiophene-centered azomethines: Structure, photophysical and electronic properties. In Journal of Molecular Structure, vol. 1204. ISSN 0022-2860.

Hexakoordinované Co(II) komplexy obsahujúce Schiffove bázy

Hexacoordinated Co(II) complexes containing Schiff bases

Jerguš Rosík[1] – Cyril Rajnák[1]
Školiteľ: Cyril Rajnák[1]
[1]Oddelenie chémie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
rosik1@ucm.sk, cyril.rajnak@ucm.sk

Abstrakt

Pripravené boli tri nové doposiaľ nepublikované komplexy Co(II), so všeobecným vzorcom $[Co(L^1)_4(NCS)_2]$ (**1**) $[Co(acac)_2(L^1)_2]$ (**2**) $[Co(acac)_2(L^2)_2]$ (**3**) {kde L^1 = (E)-N-(4-etylfenyl)-1-(pyridín-4-yl)metanimín; L^2 = (E)-N-(4-benzylfenyl)-1-(pyridín-4-yl)metanimín; acac = acetyacetonát}. Použité Schiffove bázy boli pripravené in-situ kondenzačnými reakciami 4-pyridínkarboxyaldehydu so substituovaným anilínom v polohe para. Štruktúry komplexov boli definované pomocou monokryštálovej röntgenovej difraktometrie. Geometria koordinačného polyédra komplexov bola detailne študovaná pomocou programu SHAPE. Pripravené zlúčeniny boli charakterizované pomocou elementárnej analýzy a infračervenou spektroskopiou.

Kľúčové slová: jednojadrové komplexy, hexakoordinované komplexy, kobalt(II) *N*- a *O*-donorové ligandy.

Abstract

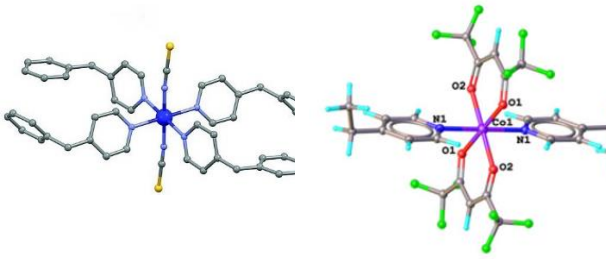
Three new previously unpublished Co(II) complexes were prepared with the general formula $[Co(L^1)_4(NCS)_2]$ (**1**) $[Co(acac)_2(L^1]$ (**2**) $[Co(acac)_2(L^2)_2]$ (**3**) where L^1 = (E)-N-(4-ethylphenyl)-1-(pyridin-4-yl)methanimine; L^2 = (E)-N-(4-benzylphenyl)-1-(pyridin-4-yl)methanimine; acac = acetylacetonate. The used Schiff bases were prepared in-situ by condensation reaction of pyridin-4-carboxyaldehyde and substituted aniline in para position. The strucutures of the complexes were defined using single crystal X-ray diffractometry. The goemetry of the coordination polyhedron of the comlexes was studied in detail using the SHAPE program. The prepared compounds were characterized using elemental analysis and infrared spectroscopy.

Key Words: mononuclear complexes, hexacoordinated complexes, cobalt(II), *N*- and *O*- donor ligands.

Úvod

Komplexy Co(II) nadobúdajú rôzne typy koordinačného polyédra. V literatúre možno nájsť kobaltnaté komplexy od oktakoordinovaných až po trikoordinované. Kordinačný polyéder môže nadobudnúť rozmanitý tvar od lineárnej štruktúry až po dodekaéder. Konkrétne, v hexakoordinovaných komplexoch (N_K = 6), charakterizuje koordinačný polyéder oktaéder, ale zväčša natiahnutá alebo stlačená tetragonálna bipyramída. [1] Motiváciou k syntéze nových komplexov Co(II) bola publikácia, v ktorej autori pripravili dva jednojadrové komplexy typu $[Co^{II}[L]_4X_2]$. Centrálny atóm je v ekvatoriálnych polohách obklopený štyrmi ligandami 4-benzylpyridínu a v dvoch axiálnych polohách sú anorganické ligandy X = Cl, NCS. Oba komplexy vykazujú magnetickým poľom podporenú pomalú magnetickú relaxáciu relaxačným časom τ = 756 ms pre X = Cl a τ = 164 ms pre X = NCS (B = 1,0 T; T = 1,9 K). [2] Ďalšou motiváciou bol vedecký článok, v ktorom autori pripravili vysokospinový hexakoordinovaný Co(II) komplex $[Co(hfac)_2(etpy)_2]$, tvorený dvomi molekulami hexafluoroacetylacetonátu a dvomi molekulami derivátu pyridínu. Tieto komplexy sú typicky paramagnetické s magnetizáciou potvrdzujúcou S = 3/2. Aj tento komplex je unikátny tým, že vykazujú pomalú magnetickú relaxáciu τ_{HF} = 20 ms pri teplote T = 2,0 K a B = 0,15 T. [3]

Tab. 1: Vybrané hexakoordinované komplexy $[Co(bzpy)_4(NCS)_2]$ a $[Co(hfac)_2(etpy)_2]$. Atómy vodíka sú odstránené pre prehľadnosť v prípade štruktúry vľavo.



[2] [3]

V našom prípade používame *O*- donorový chelátujúci ligand vo forme acetylacetonátu. L^1 a L^2 sú Schiffove bázy pripravené in-situ obsahujúce pyridínový kruh.

1 Materiál a metódy

V tejto kapitole si opíšeme použité chemikálie a metódy, ktoré sme použili pri výskume.

1.1 Chemikálie

Všetky použité chemikálie boli komerčne dostupné. Na prípravu organických ligandov sa použili 4-pyridínkarboxyaldehyd, 4-etylanilín, 4-benzylanilín. Zdrojom centrálneho atómu boli anorganické soli kobaltu: $CoCl_2$, $Co(acac)_2$. Použité rozpúšťadlá: acetonitril, metanol, dichlórmetán. $Co(SCN)_2$ bolo pripravené výmennou reakciou $CoCl_2$ s KSCN. Všetky chemikálie boli použité bez ich purifikácie.

1.2 Meracie techniky

Štruktúry komplexov sa definovali pomocou difraktometra SuperNova s použitím CCD detektora Atlas S2 so zrkadlovo kolimovaným CuKα žiarením (λ = 1,54184 Å) a pomocou programu Superflipprogram a spresnené metódou najmenších štvorcov Independent AtomModel (IAM) v Shelxl (ver. 2018/3). Prvková analýza sa uskutočnila na prístroji Flash 2000 CHNS (Thermo Scientific).

1.3 Príprava komplexu $[Co(L^1)_4(NCS)_2]$ (1).

Na prípravu komplexu **1** sa najskôr in-situ pripravila Schiffova báza. Do 50 ml varnej banky sa pridal 4-pyridínkarboxyaldehyd (65,6 µl) a 4-etylanilín (85,6 µl), pričom ako rozpúšťadlo sa použil acetonitril (15 ml). Reakcia sa intenzívne miešala pod spätným chladičom pri teplote 70°C jednu hodinu v olejovom kúpeli. Po uplynutí jednej hodiny sa k reakčnej zmesi pridal $CoCl_2$ (44,1 mg) a KSCN (66,66 mg) a následne sa reakcia intenzívne miešala pri teplote 70°C tri hodiny. Zmes roztoku sa prefiltrovala cez skladaný filtračný papier a nechala sa voľne kryštalizovať pri laboratórnej teplote jeden týždeň. Samotný kryštál bol zhlukom viacerých kryštálov o výťažku ≈ 52 %, z ktorých sa povyberali hnedé ihličky. Prvková analýza teo.: $C_{58}H_{56}CoN_{10}S_2$ (*M* = 1016.10 g /mol).: C, 68,5 ; H, 5,55 ; N, 13,78 ; exp.: C, 66,74 ; H, 5,96 ; N, 12,68 %.

1.4 Príprava komplexov $[Co(acac)_2(L^1)_2]$ (2); $[Co(acac)(L^2)_2]$ (3).

V prvom kroku sa pripravili Schiffove bázy. Do 50 ml varnej banky sa pridá 4-pyridínkarboxyaldehyd (65,6 µl) a 4-etylanilín (85,6 µl), kde sa ako rozpúšťadlo použil acetonitril (15 ml) (**2**). Pri príprave druhého komplexu sa miesto 4-etylanilínu použil 4-benzylanilín (127,1 mg) a ako rozpúšťadlo sa použila zmes rozpúšťadiel (1:1) metanol:dichlórmetán (20 ml). Reakcia prípravy Schiffovych báz prebiehala in-situ pod spätným chladičom po dobu jednej hodiny pri 70°C na olejovom kúpeli. Následne sa pridala soľ kovu, v prípade oboch komplexov **2** a **3** $Co(acac)_2$ (59,4 mg). Reakcia sa intenzívne miešala pri 70°C tri hodiny. Zmesi pripravených roztokov sa prefiltrovali cez skladané filtračné papiere a nechali voľne kryštalizovať jeden týždeň (**2**), respektíve 2 dni (**3**) pri laboratórnej teplote. V prípade komplexu (**2**) bol výťažok oranžových kryštálov ≈ 57 % a v prípade komplexu (**3**), ktoré boli opäť oranžové bol výťažok ≈ 82 %. Prvková analýza (**2**) teo.: $C_{76}H_{84}Co_2N_8O_8$ (*M* = 1355.4 g/mol).: C, 67,35 ; H, 6,25 ; N, 8,27 ; exp.: C, 66,04 ; H, 7,95 ; N, 8,31 %.
Prvková analýza (**3**) teo.: $C_{48}H_{46}CoN_4O_4$ (*M* = 801.8 g/mol).: C, 71,9 ; H, 5,78 ; N, 6,99 ; exp.: C, 72,67 ; H, 8,56 ; N, 7,01 %.

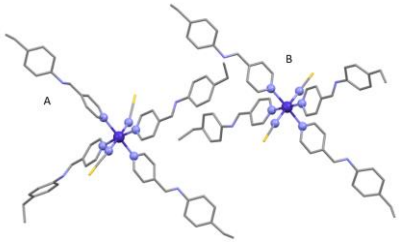
2 Výsledky a diskusia

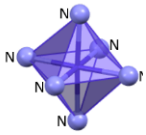
V tejto časti si opíšeme dosiahnuté výsledky a porovnáme ich so stanoveným cieľom práce.

2.1 Výsledky

V prípade komplexu **1** bola uskutočnená výmenná reakcia halogenidu za pseudohalogenid, konkrétne tiokyanatán. Tento komplex bol síce pripravovaný v pomere 2:1, ale monokryštalická röntgenova analýza odhalila naviazanie 4 molekúl organického ligandu. V infračervenej oblasti sa zjavuje pás okolo 2048 cm^{-1}, čo dokazuje prítomnosť -NSC funkčnej skupiny (Tab. 4). Monokryštalická röntgenová analýza navyše potvrdila, že komplex je zložený z dvoch komplexných jednotiek. Tie sa líšia najmä v dĺžkach väzieb medzi centrálnym atómom a donorovými atómami dusíka. V prípade komplexnej jednotky 1A je priemerná dĺžka medzi centrálnym atómom kobaltu a donorovými atómomi dusíka z NCS d_{av}(Co-NCS) = 2,075 Å, zatiaľ čo priemerná dĺžka medzi centrálnym atómom kobaltu a atómami dusíka z L^1 je d_{av}(Co-N) = 2,197 Å. Pri komplexnej jednotke 1B je d_{av}(Co-NCS) = 2,0545 Å , zatiaľ čo priemerná dĺžka medzi centrálnym atómom kobaltu a atómami dusíka z L^1 je d_{av}(Co-N) = 2,2065 Å.

Kryštalografické údaje pre komplex **1** sú uvedené v Tab. 2.

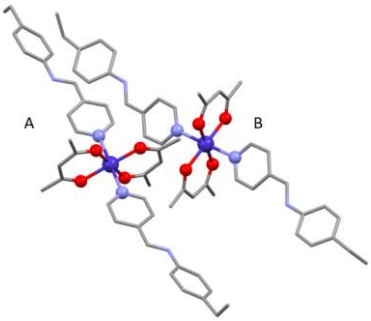


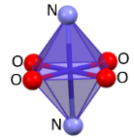


1 {CoN6} oktaéder

Obr. 1 Štruktúra komplexu **1** s vyznačeným chromofórom; atómy vodíka a dizortované atómy uhlíka odstránené pre prehľadnosť

V prípade komplexov **2** a **3** bol ako zdroj centrálneho atómu použitý acetylacetonát kobaltnatý $Co(acac)_2$. Tento chelatujúci ligand obsadil koordinačné miesta v ekvatoriálnych polohách cez *O*-donorové atómy. V axiálnych polohách môžeme opäť pozorovať tvorbu dvoch komplexných jednotiek pri komplexe **2**. V prípade komplexnej jednotky 2A je dĺžka medzi centrálnym atómom kobaltu a donorovými atómami dusíka d_{av}(Co-N) = 2,195 Å, zatiaľ čo d_{av}(Co-O) = 2,047 Å. Pri komplexnej jednotke 2B pozorujeme rovnaký trend natiahnutia väzieb v axiálnych polohách, je d_{av}(Co-N) = 2,1855 Å zatiaľ čo d_{av}(Co-O) = 2,054 Å. Kryštalografické údaje pre komplex **2** sú uvedené v Tab. 3.

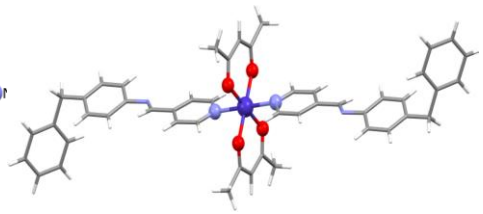


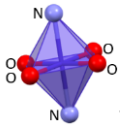


2 $\{CoO_4N_2\}$ oktaéder

Obr. 2 Štruktúra komplexu **2** s vyznačeným chromofórom; atómy vodíka odstránené pre prehľadnosť

Pri komplexe **3** sú priemerné dĺžky väzieb nasledovne d_{av}(Co-N) = 2,154 Å a d_{av}(Co-O) = 2,074 Å. Aj tu je evidentné natiahnutie väzieb v axiálnych polohách, čo potvrdzuje deformáciu oktaédra. Kryštalografické údaje pre komplex **3** sú uvedené v Tab. 4.





3 $\{CoO_4N_2\}$ oktaéder

Obr. 3 Štruktúra komplexu **3** s vyznačeným chromofórom

*Tab. 2 Kryštalografické dáta pre komplex **1***
Zdroj: (E. Samoľová, FZU AV ČR)

Kryštalografické parametre	**1**
Stechiometrický vzorec	$C_{58}H_{56}CoN_{10}S_2$
Molárna hmotnosť / g mol^{-1}	1016,10
Kryštálová sústava	monoklinická
Priestorová grupa	P 2_1
Teplota /K	100.15
Veľkosť kryštálu /mm	0.18 × 0.15 × 0.11
Z	4
a / Å	9.477(2)
b / Å	23.719(5)
c / Å	23.402(6)
α /°	90
β /°	93.568(3)
γ /°	90
V /Å^3	5250
ρ_{calc} /g cm^{-3}	1.285
Farba	Modrá
Farba	Oranžová

*Tab. 3 Kryštalografické dáta komplexu **2***
Zdroj: (E. Samoľová, FZU AV ČR)

Kryštalografické parametre	**2**
Stechiometrický vzorec	$C_{76}H_{84}Co_2N_8O_8$
Molárna hmotnosť / g mol^{-1}	1355.4
Kryštálová sústava	monoklinická
Priestorová grupa	C c
Teplota /K	95
Veľkosť kryštálu /mm	0.126 × 0.108 × 0.079
Z	4
a / Å	27.1158(5)
b / Å	18.5885(2)
c / Å	13.5718(2)
α /°	90

β /°	94.9870(14)
γ /°	90
V /Å^3	6814.86(17)
ρ_{calc} /g cm^{-3}	1.3211

*Tab. 4 Kryštalografické dáta komplexu **3***
Zdroj: (E. Samoľová, FZU AV ČR)

Kryštalografické parametre	**3**
Stechiometrický vzorec	$C_{48}H_{46}CoN_4O_4$
Molárna hmotnosť / g mol^{-1}	801.8
Kryštálová sústava	monoklinická
Priestorová grupa	P 2_1/n
Teplota /K	94.99(18)
Veľkosť kryštálu /mm	0.151 × 0.121 × 0.105
Z	4
a / Å	7.61780(13)
b / Å	8.25860(14)
c / Å	32.4499(4)
α /°	90
β /°	91.2347(11)
γ /°	90
V /Å^3	2041.03(6)
ρ_{calc} /g cm^{-3}	1.3047
Farba	Oranžová

2.2 Diskusia

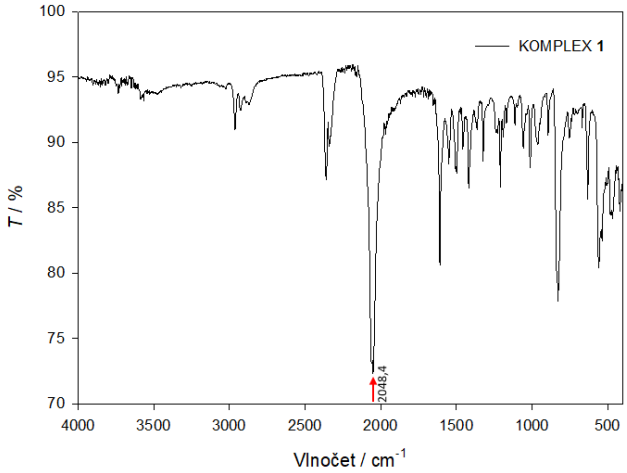
Pripravené komplexy **1-3** sú typickými predstaviteľmi jednojadrových kobaltnatých komplexov s koordinačným číslom N_k = 6. Hexakoordinované komplexy kryštalizujú v monoklinickej kryštálovej sústave a nadobudli tvar koordinačného polyédra blízky oktaédru. Komplex **1** je tvorený dvomi komplexnými jednotkami, pričom chromofór každej jednotky {CoN_6}, je tvorený šiestimi atómami dusíka, kde štyri atómy ponúkli 2 molekuly *N*–donorového ligandu L^1 a zvyšné dve sú zastúpené prostredníctvom tiokyanátu (NCS) (Obr. 1).

Chromofóry komplexov **2** a **3** {CoO_4N_2} sú v axiálnych polohách tvorené dvomi atómami dusíka, ktoré poskytli Schiffove bázy L^1 (**2**) a L^2 (**3**) a štyrmi atómami kyslíka, ktoré do koordinácie dodal chelatujúci ligand acetylacetonát (acac). Komplex **2** je tvorený dvomi nezávislými komplexnými jednotkami, v oboch prípadoch s jedným centrálnym atómom Co(II).

Geometria koordinačných polyédrov bola detailnejšie študovaná pomocou softvéru Shape. V prípade komplexu **1** komplexná jednotka A: OC-6 = 0,166 a komplexná jednotka B: OC-6 = 0,176. Z týchto zistených údajov vyplýva, že komplexná jednotka A komplexu **1** má bližšie k tvaru ideálnemu oktaédru ako komplexná jednotka B. V prípade komplexu **2**, ktorý je opäť tvorený dvomi komplexnými jednotkami to je v prípade A: OC-6 = 0,120 a v prípade B: OC-6 = 0,143. Pre komplex **3** je táto hodnota OC-6 = 0,115. Zároveň z priemerných dĺžok väzieb medzi centrálnym atómom a donorovými atómami, vidieť, že v axiálnej polohe dochádza k predĺženiu, zatiaľ čo v ekvatoriálnych polohách k skráteniu väzieb. Možno tak tvrdiť, že hlavne v prípade komplexov **2** a **3** sa geometria z okatédra deformuje na predĺženú tetragonálnu bipyramídu.

Záver

Boli pripravené 3 nové dosiaľ nepublikované hexakoordinované komplexy Co(II), ktoré sa charakterizovali metódami molekulovej spektroskopie. Pomocou infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou na ATR nástavci (FTIR-ATR) sme dokázali v prípade komplexu **1** prítomnosť väzby -NCS, ktorej nameraný pás bol na úrovni 2048,4 cm^{-1}.



Obr. 4 Graf závislosti transmitancie od vlnočtu komplexu **1** s vyznačeným pásom NCS väzby

Komplexné jednotky v zlúčenine **1** nadobudli tvar blízky oktaédru, ale v prípade látok **2** a **3** možno nájsť výraznejšiu deformáciu koordinačného polyédra typickú pre predĺženú tetragonálnu bipyramídu.

Poďakovanie

Projektu VEGA 1/0191/22 a Mgr. Erike Samoľovej, PhD. za riešenie štruktúr pomocou monokryštálovej röntgenovej difraktometrie, ako aj konzultantke RNDr. Romane Mičovej.

Použitá literatúra

[1] [1] BOČA, R. 2020 *Anorganická chémia*. 4. vyd. Trnava: vyd. Prešov, 2020. 380 s. ISBN 978-80-8105-551-5.

[2] RAJNÁK, C. et al. (2017) Field-Supported Slow Magnetic Relaxation in Hexacoordinate Co^{II} Complexes with Easy Plane Anisotropy. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2017, p. 1520 – 1525.

[3] MIČOVÁ, R. et al. (2023) Easy-axis magnetic anisotropy in tetragonally elognated cobalt(II) complexes beyond the spin-Hamiltonian formalism. *Dalton Trans.*, 2023, **52** 7885.

Syntéza a charakterizácia štvorjadrových Cu(II) μ_4-oxido klastrov s N-donorovými ligandmi

Synthesis and Characterisation of Tetranuclear Cu(II) μ_4-oxido Clasters with N-donor Ligands

Ráchel Rusová[1] – Cyril Rajnák[1]
Školiteľ: Cyril Rajnák[1]
[1]Ústav chémie a environmentálnych vied, Oddelenie chémie, Fakulta prírodných vied
Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Nám. J. Herdu 2, Trnava, 917 01
rusova4@ucm.sk, cyril.rajnak@ucm.sk

Abstrakt

Štvorjadrové Cu(II) μ_4-oxido klastre s rôznymi ligandmi boli pred pár dekádami horúcou témou z experimentálnych, ale aj teoretických aspektov. V posledných rokoch záujem o štúdium týchto látok znovu narastá, či už pre ich štruktúrne, katalytické alebo magnetické vlastnosti.

Cieľom štúdie bolo objasnenie spôsobu syntézy $[Cu_4OCl_6(4\text{-}phpy)_4]$ (komplex **3**) bez využitia inertnej atmosféry (*4-phpy* = 4-fenoxypyridín). Jednou syntézou sa prekvapivo podarilo pripraviť tri rôzne druhy kryštálov, ale len dva komplexy - $[Cu_4Cl_8(4\text{-}phpy)_8]$ (komplex **1** a **2**), $[Cu_4OCl_6(4\text{-}phpy)_4]$ (komplex **3**). Štruktúry izolovaných monokryštálov boli namerané monokryštálovou röntgenovou difraktometriou (SC-XRD) a potvrdené infračervenou spektroskopiou (IR), kde sme zaznamenali významnú vibráciu väzieb Cu—O pri 619 cm^{-1} (komplex **3**). Stanovené boli aj teploty topenia, kde teplota topenia komplexu **3** dosahovala nadpriemerné hodnoty. Charakterizované bolo aj prvkové zastúpenie (C, H, N) v komplexe **1**. Pomocou geometrického indexu τ_5 bola vypočítaná geometria koordinačných polyédrov.

Kľúčové slová: Cu(II) komplexy, polyjadrové Cu(II) komplexy, μ_4-oxido klastre.

Abstract

Tetranuclear Cu(II) μ_4-oxido clusters with different ligands were a hot topic from experimental as well as theoretical aspects a few decades ago. In recent years, interest in the study of these substances is growing again, either for their structural, catalytic or magnetic properties.

The aim of the study was to clarify the synthesis method of $[Cu_4OCl_6(4\text{-}phpy)_4]$ (complex **3**) without using an inert atmosphere (*4-phpy* = 4-phenoxypyridine). One synthesis surprisingly succeeded in preparing three different types of crystals, but only two complexes - $[Cu_4Cl_8(4\text{-}phpy)_8]$ (complex **1** and **2**), $[Cu_4OCl_6(4\text{-}phpy)_4]$ (complex **3**). The structures of the isolated single crystals were measured by single crystal X-ray diffractometry (SC-XRD) and confirmed by infrared spectroscopy (IR), where we noted a significant vibration of the Cu—O bonds at 619 cm^{-1} (complex **3**). Melting points were also determined, where the melting point of complex **3** reached above-average values. The element representation (C, H, N) in complex **1** was also characterized. The geometry of the coordination polyhedra was calculated using the geometric index τ_5.

Key Words: Cu(II) complexes, polynuclear Cu(II) complexes, μ_4-oxido clasters.

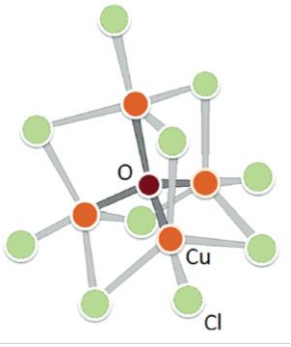
Úvod

Polyjadrové Cu(II) komplexy s viacerými mostíkmi medzi kovovými centrami typu $[Cu_4OCl_xL_4]$ (L = ligand), pritiahli v minulosti mnoho pozornosti z teoretického, ale aj experimentálneho uhla pohľadu. Veľká časť výskumu bola venovaná analýze ich štruktúrnych a magnetických vlastností [1].

Klastre tohto typu dokonca nachádzame aj v prírode. Minerál ponomarevit $K_4[Cu_4OCl_{10}]$ vzniká vo vulkanických fumarolách v rozmedzí teplôt 280-450 °C (Obr. 1).

Prvá laboratórna syntéza so štruktúrnym motívom Cu_4OCl_6 prebehla v r. 1966 (Bertrand a kol.). a v nasledujúcich dekádach bolo pripravených mnoho ďalších takýchto komplexov. Látky boli syntetizované za inertných podmienok a tak ako aj ich prírodný predchodca, boli citlivé na vlhkosť [2].

Ako ligandy sa väčšinou využívali molekuly rozpúšťadla (Lewisové zásady). Komplex má geometriu distordovanej trigonálnej bipyramídy.



Obr. 1. Štruktúra ponomarevitu (K^+ ióny nie sú zobrazené z dôvodu lepšej priehľadnosti). Kryštály boli objavené (Kamčatka, Rusko) po veľkej erupcii sopečného pohoria Tolbačik v rokoch 1975-1976.
Zdroj: [2]

Na menďnaté centrá sú najčastejšie naviazané N- alebo O-donory (Bertrand, 1967; Killbourn a Dunitz, 1967), ale taktiež môžu vrchol koordinačného polyédra okupovať aj halidové anióny (Jackson et al, 1996) [3].

Meďnaté komplexy sa využívajú aj ako katalyzátory v oxidačných reakciách. Viacero kovových centier v jednej molekule má synergický účinok v rámci elektrónového transferu a možno ho považovať za taký ,,viacelektrónový balíček", ktorého efekt je v týchto reakciách žiaduci [4].

Cieľom práce bola syntéza μ_4-oxido klastrov bez využitia inertnej atmosféry s N-donorovými ligandmi. Pripravené koordinačné zlúčeniny boli následne charakterizované v oblasti ich štruktúry.

1 Materiál a metódy

V tejto časti si popíšeme použité chemikálie a techniky, ktoré sme potrebovali na dosiahnutie výsledkov.

1.1 Chemikálie

Ligandy 4-fenoxypyridín (TCI, 95 %) a 4-benzylpyridín (Sigma-Aldrich, 98 %); meďnatá soľ $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (Lachema N. P. Brno); rozpúšťadlá acetonitril (MikroCHEM, 99,5 %), etanol (nedenaturovaný, MikroCHEM, 96%). Všetky chemikálie boli komerčne zakúpené a ďalšie čistenie nebolo potrebné.

1.2 Využité techniky

Tvar a kvalita kryštálov boli študované optickým mikroskopom *Zeiss Stemi 235.* Na stanovenie teplôt topenia bol využitý termooptický prístroj *Biobase (Melting Point Apparatus).* Prvkové zastúpenie bolo namerané prístrojom *Flash 2000 CHNS*. Infračervené spektrá boli namerané na prístroji *IRAffinity-1 Schimadzu* s ATR nástavcom v rozsahu 500-4000 cm^{-1}. Na štúdium štruktúrnych vlastností bol využitý difraktometer *SuperNova* s využitím CCD detektora *Atlas S2* so zrkadlovo kolimovaným CuK_α žiarením (λ = 1,54184 Å). Štruktúry boli riešené pomocou programu *Superflipprogram* a korigované metódou najmenších vzorcov.

1.3 Príprava komplexu $[Cu_4OCl_6(4\text{-}phpy)_4]$

Dihydrát chloridu meďnatého (0,33 mmol; 37,5 mg) bol rozpustený v 50 cm^3 varnej banke v 15 ml acetonitrilu. Následne bol do reakčnej zmesi pridaný 4-fenoxypyridín (0,88 mmol; 150,66 mg). Pripravená zmes refluxovala po dobu 2 h pri teplote 85 °C. Po skončení refluxu bola prefiltrovaná cez skladaný filtračný papier a nechala sa voľne kryštalizovať. V priebehu týždňa boli v kadičke pozorované svetlomodré $[Cu_4Cl_8(4\text{-}phpy)_8]$ (**A**) a tmavomodré $[Cu_4Cl_8(4\text{-}phpy)_8]$ (**B**) kryštály.

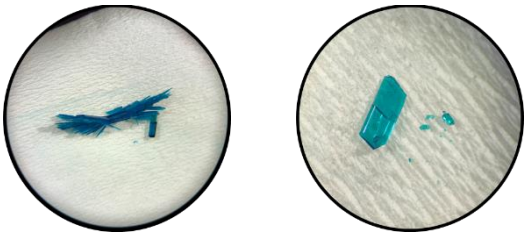
Pripravená látka bola rekryštalizovaná v 10 ml etanolu a znovu sa nechala voľne kryštalizovať za vzniku hnedých platničiek $[Cu_4OCl_6(4\text{-}phpy)_4]$ (komplex **3**). *Výťažky:* 24,2 mg, 5,7 % (komplex **1**); 246,1 mg, 58 % (komplex **2**); 20 mg, 7 % (komplex **3**). *Prvková analýza:* teo.: C, 55,41; H, 3,81; N, 5 %; exp.: C, 55,04; H, 3,55; N, 5,93 % (komplex **2**). *Teploty topenia:* 77,5 °C (komplex **1** a **2**); >200 °C (komplex **3**) [5].

2 Výsledky a diskusia

V tejto kapitole si opíšeme dosiahnuté výsledky a porovnáme ich s naším cieľom práce.

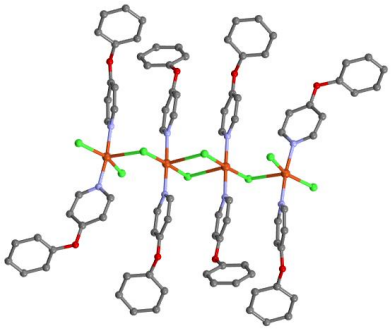
2.1 Štruktúrne vlastnosti

Monokryštálová röntgenová difraktometria odhalila, že pri kryštáloch **A** a **B** sa napriek rozdielnemu vzhľadu (Obr. 2) jedná o totožnú látku.



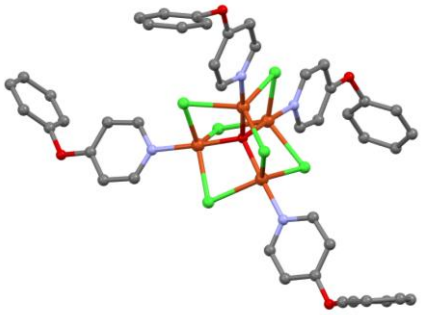
Obr. 2 Kryštalické formy komplexu **1:** **B**-vľavo, **A**-vpravo.
Zdroj: Autori

Ide o štvorjadrový reťazový komplex (Obr. 3), kde na každom centrálnom atóme Cu sú naviazané tri chloridové anióny a dva dusíky poskytované *4-phpy*. Dĺžky väzieb vo vnútorných dvoch a vonkajších dvoch koordinačných polyédroch sú zhodné, rovnako aj uhly. Chloridové anióny a vodíky vytvárajú vodíkové väzby s priemernou dĺžkou 2,836 Å. Komplexy kryštalizujú v triklinickej kryštálovej sústave (Tab. 3).



Obr. 3 Štruktúra komplexu **1** znázornená v programe MERCURY (vodíky nie sú zobrazené kvôli lepšej prehľadnosti). Cu – Oranžová, Cl – zelená, N – fialová, O – červená, C – šedá.
Zdroj: Autori

Komplex **3** kryštalizuje rovnako v triklinickej kryštálovej sústave. Je tvorený štyrmi Cu jadrami, ktoré prepájajú μ-mostíkujúce Cl^- ióny a μ_4-mostíkujúci atóm kyslíka v strede (Obr. 4). Koordinačný polyéder okolo každého medeného centra vytvára geometriu trigonálnej bipyramídy. Priemerné dĺžky väzieb Cl—Cu sú 2,411 Å; Cu—O 1,905 Å; Cu—N 1,971 Å. Veľkosti uhlov Cu—O—Cu a Cu—Cl—Cu sa odlišujú len mierne s priemernou veľkosťou 109,46° a 80,42°. Uhly zvierané ramenami Cl—Cu—N sú mierne nepravidelnejšie, čo môže byť spôsobené π interakciami aromatických kruhov.



Obr. 4 Štruktúra komplexu **3** znázornená v programe MERCURY (vodíky nie sú zobrazené kvôli lepšej prehľadnosti). Cu – Oranžová, Cl – zelená, N – fialová, O – červená, C – šedá.
Zdroj: Autori

Tab. 1 Kryštalografické údaje komplexov **1** a **3**.

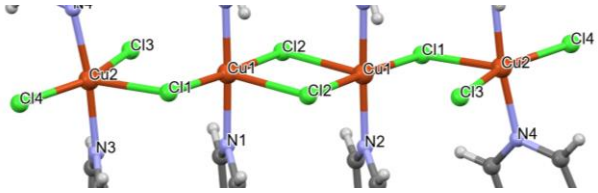
	Komplex 1	**Komplex 3**
Sumárny vzorec	$C_{44}H_{36}Cl_4Cu_2N_4O_4$	$C_{44}H_{36}Cl_6Cu_4N_4O_5$
M_r (g/mol)	953,7	1167,63
Kryštálová sústava	Triklinická	Triklinická
Priestorová grupa	P1	P1
V (Å^3)	2053,92	2349,91
D_x (g/cm^3)	1,5421	1,650
a (Å)	10,4947	10,83738
b (Å)	14,5971	10,84444
c (Å)	15,2126	20,0896
α (deg)	68,397	84,4726
β (deg)	71,441	89,3672
γ (deg)	82,642	89,9715
Z	2	2

Pentakoordinované koordinačné zlúčeniny môžu nadobúdať dva geometrické extrémy – trigonálnu bipyramídu (τ_5 = 0; α = 120°) a štvorcovú pyramídu (τ_5 = 1; α = β = 180°). Avšak študované látky sa väčšinou náchádzajú v nepravidelnejších ,,intermediátnych" systémoch, preto bol zavedený tzv. geometrický (štruktúrny) index τ_5 (Addison et al., 1984), ktorý vypočítame podľa vzťahu 1:

$$\tau_5 = \frac{\beta - \alpha}{60} \quad (1)$$

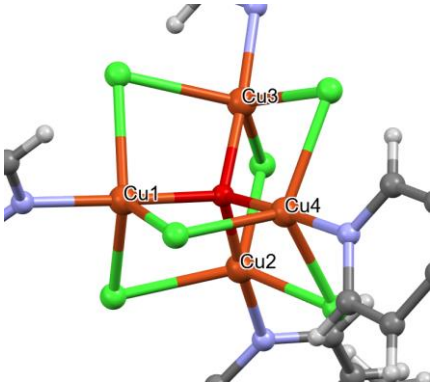
kde α a β sú dva najväčšie uhly koordinačného polyédra, pričom α < β. Parameter τ_5 nadobúda hodnoty 0-1 (0 – štvorcová pyramída, 1 – trigonálna bipyramída) [6, 7].

Vypočítali sme štruktúrny index τ_5 pre všetky komplexy a jednotlivé koordinačné centrá. Výsledné hodnoty geometrického indexu $\tau_{5(Cu2)}$ = 0,29 a $\tau_{5(Cu1)}$ = 0,012 naznačujú, že v prípade koordinačného centra Cu1 sa jedná o takmer dokonalú štvorcovú pyramídu z pohľadu uhlov zvieraných väzbami v polyédri (Obr. 5). Z pohľadu dĺžky väzieb komplex podlieha distorzii vplyvom efektu Jahna-Tellera (väzby Cu—Cl sú približne o 0,3 Å dlhšie) [8].



Obr. 5 Pohľad na koordinačné polyédre komplexu **1** (MERCURY).
Zdroj: Autori

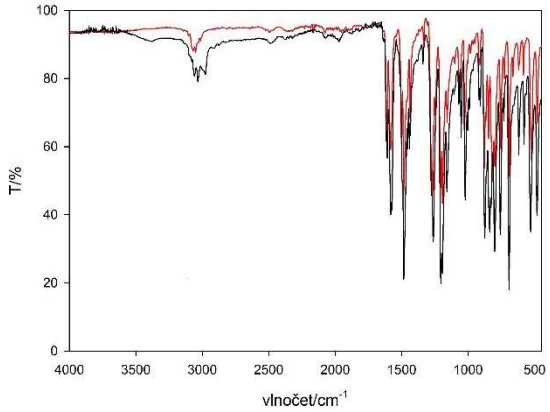
Rovnakým spôsobom boli vypočítané geometrické indexy komplexu **3** (Obr. 6) o hodnotách τ_5 = 0,924 (Cu1); 0,957 (Cu2); 0,856 (Cu3); 0,902 (Cu4), ktoré nasvedčujú štruktúre trigonálnej bipyramídy. Polyédre majú podľa nameraných uhlov pomerne rovnomernú štruktúru, avšak tak ako väčšinou Cu(II) komplexov, aj tento podlieha ekvatoriálnej distorzii vplyvom efektu Jahna-Tellera [8].



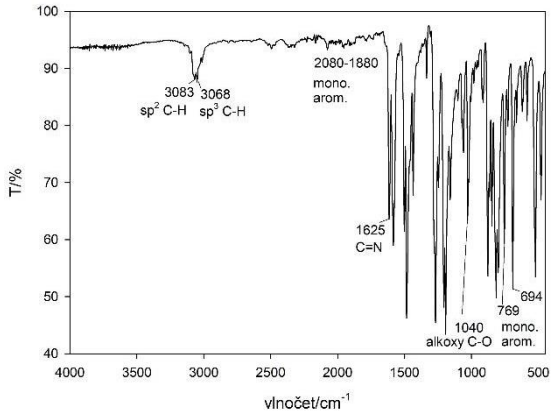
Obr. 6 Pohľad na koordinačné centrá komplexu **3** (MERCURY).
Zdroj: Autori

2.2 Infračervená spektroskopia

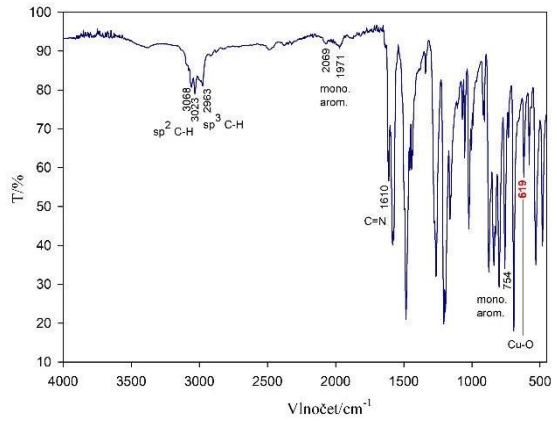
Porovnaním infračervených spektier (IČ spektier) v rozsahu 500-4000 cm^{-1} sme potvrdili, že pri komplexoch **1** a **2** sa jedná o rovnakú látku (Obr. 7). Identifikovali sme vibrácie monosubstituovaného aromátu pri vlnočte 2080-1880 (w) a 769 (s) a 694 (s) cm^{-1}, C=N väzieb pri 1625 cm^{-1} a vibrácie alkoxy C—O väzieb pri 1040 cm^{-1} (Obr. 8). Keďže sa jedná o látky s takmer rovnakým prvkovým zložením, IČ spektrá pripravených zlúčenín sú veľmi podobné, avšak v IČ spektre komplexu **3** sme zaznamenali špecifickú vibráciu Cu—O väzieb pri vlnočte 619 cm^{-1} (Obr. 9).



Obr. 7 Porovnanie infračervených spektier kryštálov **A** (čierna) a **B** (červená).
Zdroj: Autori



Obr. 8 Infračervené spektrum komplexu **1 .**
Zdroj: [5]



Obr. 9 Infračervené spektrum komplexu **3**. Vibrácia Cu—O väzby pri 619 cm^{-1}.
Zdroj: [5]

Záver

Pri syntéze $[Cu_4OCl_6(4\text{-}phpy)_4]$ (komplex **3**) sme získali tri rôzne vyzerajúce kryštály. Štúdiom štruktúrnych vlastností sme zistili, že v prípade kryštálov **A** a **B** sa jedná o úplne totožnú zlúčeninu $[Cu_4Cl_8(4\text{-}phpy)_8]$, napriek rozdielnemu vzhľadu (farba, tvar kryštálov).

Podarilo sa nám objasniť spôsob prípravy komplexu **3** a podrobnejšie opísať jeho štruktúru. V IČ spektre sme zaznamenali pás pri 619 cm^{-1}, ktorý prislúcha vibrácii väzieb Cu—O. Stanovenie teplôt topenia preukázalo nadpriemerne vysokú teplotu topenia komplexu **3** (> 200 °C) v porovnaní s v minulosti pripravenými jedno-, ale aj polyjadrovými Cu(II) komplexami s N-donorovými ligandmi na báze pyridínu (Tomiová, 2022).

V budúcnosti by bolo zaujímavé preskúmať aj iné vlastnosti meďnatých štvorjadrových klastrov typu $[Cu_4OCl_6L_4]$, napr. magnetizmus.

Poďakovanie

Projektu VEGA 1/0191/22 a Mgr. Erike Samoľovej, PhD. Za riešenie štruktúr pomocou monokryštálovej röntgenovej difraktometrie, RNDr. Romane Mičovej. A v neposlednom rade, za odborné vedenie, by som sa chcela poďakovať p. doc. RNDr. Cyrilovi Rajnákovi, PhD., et PhD.

Použitá literatúra

[1] Cortés, P. et al. 2006. Three oxo complexes with a tetra-nuclear $[Cu_4(I_2\text{-}Cl)_6(I_4\text{-}O)]$ unit. In Acta Crystalographica section C, vol. C62, pp. m311-m314. ISSN 0108-2701.

[2] Becker, S. et al. 2015. Investigations Concerning $[Cu_4OX_6L_4]$ Cluster Formation of Copper(II) Chloride with Amine Ligands Related to Benzylamine. In European Journal of Inorganic Chemistry, vol. 2015, no. 14, pp. 2437-2447. ISSN 1099-0682.

[3] Wheeler, K. A. et al. 2014. The bimolecular structure of aquahexa-l-chlorido-l_4-oxidotris(tetrahydrofu-ran-jO)tetracopper(II)–hexa-lchlorido-l_4-oxido-te-trakis-(tetrahydrofuranjO)tetracopper(II) tetrahy-drofuran (2/1/4). In Acta Crystalographica Section C, vol. C70, pp. 306-311. ISSN 2053-2296.

[4] Becker, S. et al. 2016. Copper Chloride Catalysis: Do μ_4-Oxido Copper Clusters Play a Significant Role? 2016. In Inorganic Chemistry, vol. 55, no. 8, pp. 3759-3766. ISSN 0020-1669.

[5] Ráchel Tomiová. 2022. Syntéza a charakterizácia jednojadrových meďnatých komplexov: Bakalárska práca. Trnava: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, 60-61 s.

[6] Wikipedia: Geometry Index [online]. Wikipedia: Wikipedia, The Free Encyclopedia, 2024 [cit. 6.3.2024]. Dostupné z: http://www.en.wikipedia.org/

[7] Addison, A. W. et al. 1984. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen–sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua[1,7-bis(*N*-methylbenzimidazol-2′-yl)-2,6-dithiaheptane]cop-per(II) perchlorate. In Journal of Chemical Society, Dalton Transactions, vol. 7, pp. 1349-1356. ISSN 1477-9234.

[8] Roy, S. et al. 2011. Cu(II) complexes with square pyramidal $(N_2S)CuCl_2$ chromophore: Jahn–Teller distortion and subsequent effect on spectral and structural properties. In Inorganica Chimica Acta, vol. 370, p. 247-253. ISSN 0020-1693.

Selektívnosť koordinačného polyédra Fe(III) komplexov pomocou Schiffovej zásady

Selectivity of coordination polyhedron Fe(III) complexes using Schiff base

Vanessa Šušuková[1] – Cyril Rajnák[1]
Školiteľ: Cyril Rajnák[1]
[1]Oddelenie chémie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
susukova1@ucm.sk, cyril.rajnak@ucm.sk

Abstrakt

Reakciou 5-bromo-3-metoxysalicylaldehydu s furfurylamínom respektíve tetrahydrofurfurylamínom boli syntetizované a izolované dve nové N, O- donorové Schiffove zásady. Menovite, (Z)-4-bromo-2-metoxy-6-((((tetrahydrofurán-2-yl)metyl)imino)metyl)fenol (**L**^{1}) a (Z)-4-bromo-2-(((furán-2-ylmetyl)imino)metyl)-6-metoxyfenol (**L**^{2}). Následne sa pripravili jednojadrové železité komplexy [Fe^{III}(L^{1})(bmsa)(Cl)] (**1**) s chromoforom {FeO$_4$NCl} a [Fe^{III}(L^{2})$_2$(Cl)] (**2**) s chromoforom {FeN$_2$O$_2$Cl}. Z izolovaných monokryštálov všetkých syntetizovaných zlúčenín bola pomocou monokryštálovej röntgenovej difraktometrie odhalená ich štruktúra, ako aj prislúchajúce kryštalografické parametre. Zistilo sa, že použitím **L**^{1} sa preferuje tvorba hexakoordinovaného komplexu **1** na rozdiel od pentakoordinovaného **2**, v ktorom sa použil **L**^{2}. Geometrie koordinačných polyédrov komplexov sa študovali pomocou softwaru SHAPE 2.1.

Kľúčové slová: Fe^{3+} komplexy, Schiffove zásady, jednojadrové komplexy

Abstract

Two new N, O- donor Schiff bases: (Z)-4-bromo-2-methoxy-6-((((tetrahydrofuran-2-yl)methyl)imino)methyl)phenol (**L**^{1}) and (Z)-4-bromo-2-(((furan-2-ylmethyl)imino)methyl)-6-methoxyphenol (**L**^{2}) were synthesized and isolated by the reaction of 5-bromo-3-methoxysalicylaldehyde with furfurylamine or tetrahydrofurfurylamine. Subsequently, mononuclear Fe^{3+} complexes [Fe(L^{1})(bmsa)(Cl)] (**1**) with chromophore {FeO$_4$NCl} and [Fe(L^{2})$_2$(Cl)] (**2**) with chromophore {FeN$_2$O$_2$Cl} were prepared. The structures of the isolated single crystals of all synthesized compounds were confirmed using single-crystal X-ray diffraction, along with their corresponding crystallographic parameters. It was found that the use of L^{1} favored the formation of the hexacoordinated complex **1** over the pentacoordinated complex **2** in with **L**^{2} was used. The geometries of the coordination polyhedron of the complexes were studied using the SHAPE 2.1 software.

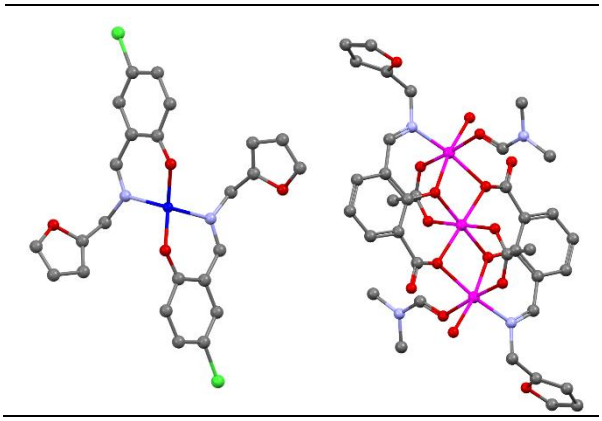
Key Words: Fe^{3+} complexes, Schiff bases, mononuclear complexes

Úvod

Organické ligandy, ktorých štruktúra je tvorená furfurylamínmi a ich derivátmi, môžu vytvárať s centrálnym atómom kovu jednojadrové až trojjadrové komplexy.[1-5] Tieto komplexy nadobúdajú rôzne koordinačné čísla od N_k= 4 až N_k= 6.

Príkladom jednojadrového komplexu, je diamagnetický komplex tvorený zinkom [Zn(C$_8$H$_6$NO)$_2$Cl$_2$] (Tab. 1), ktorý bol skúmaný pre jeho potenciálne antibakteriálne a antitumorové účinky.[1] Medzi dvojjadrové komplexy, patrí komplex [Co$_2$L$_2$Cl$_2$(CH$_3$OH)$_2$], ktorého centrálne atómy kobaltu sú obklopené atómom dusíka, chlóru, štyrmi atómami kyslíka. Koordinačné polyédre sú blízke geometrii oktaédra.[2] Príkladom trojjadrového komplexu je napríklad komplex [Ni$_3$(C$_9$H$_{11}$N$_2$O$_4$)$_2$O$_8$] (Tab. 1).[3]

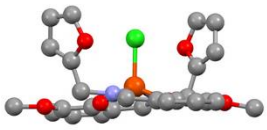
Tab. 1 Vybrané komplexy [Zn(C$_8$H$_6$NO)$_2$Cl$_2$]; [Ni$_3$(C$_9$H$_{11}$N$_2$O$_4$)$_2$O$_8$]. Atómy vodíka sú pre prehľadnosť odstránené. Farebný kód: šedá - uhlík, červená - kyslík, fialová - dusík, zelená - chlór, ružová - nikel, modrá - zinok .



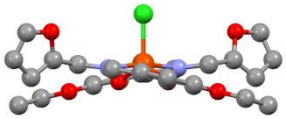
[1]	[3]

Jednojadrové komplexy Fe(III), ktorých ligandy sú tvorené furfurylamínmi, sú pentakoordinované, (N_k=5) a ich koordinačný polyéder nadobúda geometriu: SPY (štvorcová pyramída); TBPY (trigonálna bipyramída) (Tab. 2). Kation Fe^{3+} sa v týchto komplexoch koordinuje cez atómy dusíka, ktoré pochádzajú z imínovej väzby -N=C- a cez kyslíky pochádzajúce z hydroxylovej skupiny -OH, nachádzajúcej sa na derivátoch salicylaldehydu. Koordináciu uzatvára zvyšok z anorganickej soli napr. atóm halogénu. V týchto komplexoch, bola odhalená magnetickým poľom indukovaná pomalá magnetická relaxácia, s relaxačným časom τ ~ 0,40 - 0,64s.[4]

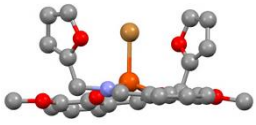
Tab. 2 Vybrané pentakoordinované komplexy Fe(III) [5]



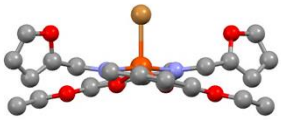
SPY



TBPY



SPY



TBPY

1 Materiál a metódy

V tejto kapitole si opíšeme použité chemikálie a metódy ich spracovania.

1.1 Chemikálie

Všetky zakúpené chemikálie boli použité v pôvodnom stave. Reaktanty (5-bromo-3-metoxysalicylaldehyd, furfurylamín, tetrahydrofurfurylamín, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$) a rozpúšťadlá (ACN) boli použité bez ich ďalšej purifikácie.

1.2 Meracie techniky

Zber údajov pre štruktúry **1**-**4**, sa uskutočňoval pomocou difraktometra SuperNova s použitím CCD detektora Atlas S2 so zrkadlovo kolimovaným CuKα žiarením (A = 1,54184 Å). Štruktúry boli vyriešené pomocou programu Superflipprogram a spresnené pomocou metódy najmenších štvorcov Independent AtomModel (IAM) v Shelxl (ver. 2018/3). Geometrie chromofórov boli vypočítané pomocou programu SHAPE 2.1 (LLUNELL a kol., 2013). Prvková analýza bola uskutočnená na prístroji Flash 2000 CHNS (Thermo Scientific). Teploty topenia boli stanovené termomikroskopickou metódou na Koeflerovom bloku - Biobase (Melting Point Apparatus).

1.3 Príprava Schiffovej zásady *(Z)-4-bromo-2-metoxy-6-((((tetrahydrofurán-2-yl)metyl)imino)metyl)fenolu* (L^1)

Do 50 cm^3 varnej banky bol pridaný 5-bromo-3-metoxysalicylaldehyd (6,12 mmol), rozpustený v ACN (20 cm^3). Následne sa pridal tetrahydrofurfurylamín (6,12 mmol) a roztok sa nechal refluxovať 3 h. Následne bol odfiltrovaný cez skladaný filtračný papier a nechal sa voľne kryštalizovať. Kryštály mali žltú farbu a výťažok bol ~ 63 %. Štruktúrne parametre sú uvedené v Tab. 3. Teplota topenia: 92,5 – 94°C. Prvková analýza (**1**) teo.: $C_{13}H_{16}BrNO_3$ (*M*= 314,18 g/mol).: C, 49,70 ; H, 5,13 ; N, 4,46 ; exp.: C, 49,23 ; H, 6,92 ; N, 4,37 %.

1.4 Príprava Schiffovej zásady (Z)-4-bromo-2-(((furán-2-ylmetyl)imino)metyl)-6-metoxyfenolu (L^2)

Do 50 cm^3 varnej banky bol pridaný 5-bromo-3-metoxysalicylaldehyd (6,12 mmol), rozpustený v ACN (20 cm^3). Následne bol pridaný furfurylamín (6,12 mmol) a roztok sa nechal refluxovať 3 h. Roztok bol vložený do mrazničky a kryštály boli odobrané po týždni. Mali žltú farbu a výťažok bol ~ 5 %. Teplota topenia: 77,8 – 79°C. Prvková analýza teo.: $C_{13}H_{12}BrNO_3$ (*M*= 310,15 g/mol).: C, 50,34 ; H, 3,90 ; N, 4,52 ; exp.: C, 50,20 ; H, 4,96 ; N, 4,49 %.

1.5 Príprava komplexu [Fe(L^1)(bmsa)(Cl)] (1)

Komplex bol pripravovaný metódou „in vitro“ nasledujúcim spôsobom: do 50 cm^3 varnej banky bol pridaný 5-bromo-3-metoxysalicylaldehyd (4,12 mmol), rozpustený v ACN (20 cm^3) a tetrahydrofurfurylamín (4,12 mmol). Roztok sa nechal refluxovať 30 min., pridala sa anorganická soľ $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (2,06 mmol) a zmes sa nechala refluxovať ďalšie 2 h. Kryštály hnedej farby boli odobraté z roztoku po 3 dňoch. Výťažok bol ~ 36 %. Štruktúrne parametre sú uvedené v Tab. 4. Prvková analýza teo.: $C_{21}H_{21}Br_2ClFeNO_6$ (*M*= 634.50 g/mol).: C, 39,75 ; H, 3,34 ; N, 2,21 ; exp.: C, 39,79 ; H, 4,09 ; N, 2,76 %.

1.6 Príprava komplexu [Fe(L^2)$_2$(Cl)] (2)

Komplex bol resyntetizovaný (T. Laluhová, 2020) a pripravený metódou „in vitro“ nasledujúcim spôsobom: do 50 cm^3 varnej banky bol pridaný 5-

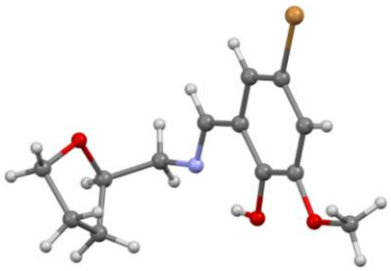
bromo-3-metoxysalicylaldehyd (4,12 mmol), rozpustený v ACN (20 cm^3) a furfurylamín (4,12 mmol). Roztok sa nechal refluxovať 30 min. a pridala sa anorganická soľ $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (2,06 mmol). Zmes sa nechala refluxovať 2 h. Kryštály hnedej farby boli odobraté z roztoku po 4 dňoch. Výťažok bol ~ 47 %. Štruktúrne parametre sú uvedené v Tab. 5. Prvková analýza teo.: $C_{26}H_{22}Br_2ClFeN_2O_6$ (M= 709.57 g/mol).: C, 44,01 ; H, 3,12 ; N, 3,95 ; exp.: C, 43,70 ; H, 4,06 ; N, 4,13 %.

2 Výsledky a diskusia

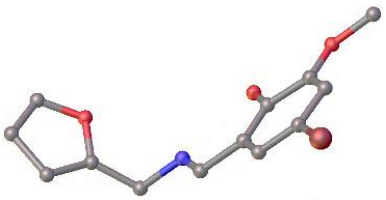
V tejto časti si opíšeme dosiahnuté výsledky a porovnáme ich s našimi cieľmi práce.

2.1 Výsledky

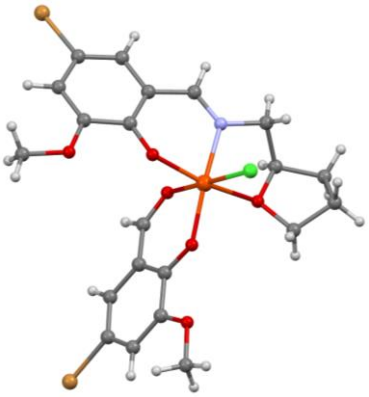
Pridaním anorganickej soli, do roztoku ligandu **L^1** sa roztok oranžovo-hnedej farby zmenil na čiernu. Kryštály boli izolované z roztoku vo forme hnedých ihličiek vzrastených do zhlukov. V prípade ligandu **L^2** sa po pridaní anorganickej soli zmenil roztok zo žltej farby na čiernu. Z roztoku boli izolované kryštály hnedej farby. Centrálny atóm Fe(III) komplexu **1** (N_k = 6) je obklopený 5-bromo-3-metoxysalicylaldehydom (poskytujúcim dva O- donorové atómy), ďalej atómom chlóru a ligandom **L^1**, ktorý pre zmenu poskytol jeden N- a dva O- donorové atómy (Obr. 3). Koordinačný polyéder komplexu **2** (N_k = 5) má tvar štvorcovej pyramídy (Obr. 5). Centrálny atóm Fe(III) je koordinovaný dvoma chemicky rovnakými ligandami L^2 prostredníctvom N- a O- donorových atómov a jedným atómom chlórom pochádzajúcim z anorganickej soli použitej pri syntéze (Obr. 4).



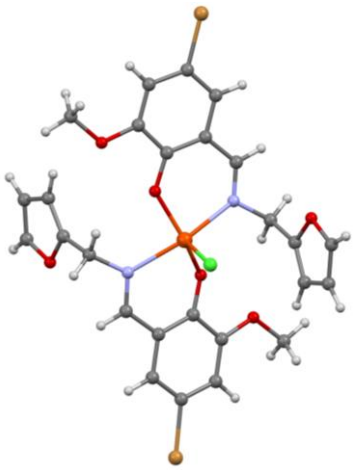
Obr. 1 Štruktúra ligandu **L^1** bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0
Zdroj: [6]



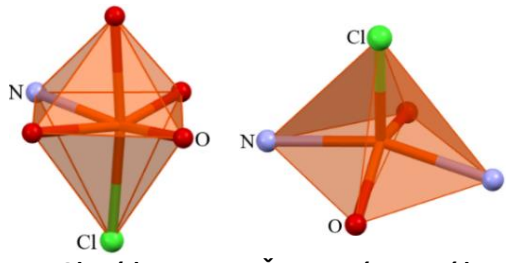
Obr. 2 Štruktúra ligandu **L^2** bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0
Zdroj: [6]



Obr. 3 Štruktúra komplexu $Fe(L^1)(bmsa)(Cl)]$ (**1**) bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0
Zdroj: [6]



Obr. 4 Štruktúra komplexu $[Fe(L^2)_2(Cl)]$ (**2**) bola vykreslená pomocou programu Mercury 4.2.0
Zdroj: [6]



Oktaéder **Štvorcová pyramída**

1 **2**

Obr. 5 Koordinačné polyédre Fe(III) komplexov **1, 2**

2.2 Diskusia

Komplex **2**, tvorený ligandom obsahujúci furfurylamín je pentakoordinovaný. Toto zistenie je v súlade s vedeckou literatúrou.[5] Avšak komplex **1** má odlišný tvar koordinačného polyédra. Prekvapivá je tvorba donor-akceptorovej väzby s 5-bromo-3-metoxysalicylaldehydom. Ten je prítomný buď z dôvodu nezreagovania s príslušným amínom, alebo počas prípravy komplexu došlo k prirodzenému alebo katalyzovanému roztrhnutiu imínovej väzby. Zvyšné donorové atómy pochádzajú z ligandu **L**[1].

Štruktúrne parametre	**L**[1]
Empirický vzorec	$C_{13}H_{16}BrNO_3$
Molárna hmotnosť	314.2 g/mol
Kryštálová sústava	monoklinická
Priestorová mriežka	P 2_1/c
Teplota (K)	95.0(2)
Veľkosť kryštálu (mm)	0.192 × 0.129 × 0.057
Z	4
a (Å)	12.9943(5)
b (Å)	8.5901(2)
c (Å)	13.1174(4)
α	90
β	119.052(4)
γ	90
V(Å^3)	1279.97(9)
ρ_{calc}(g/cm^3)	1.6304
Farba	žltá

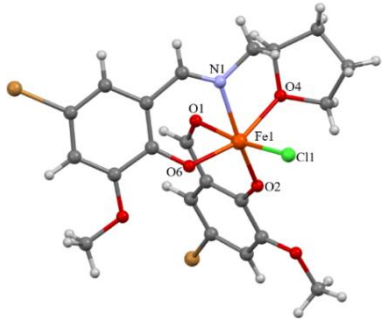
Tab. 3 Kryštalografické údaje pre ligand L[1]

Štruktúrne parametre	**1**
Empirický vzorec	$C_{21}H_{21}Br_2ClFeNO_6$
Molárna hmotnosť	634.5 g/mol
Kryštálová sústava	ortorombická
Priestorová mriežka	P b c a
Teplota (K)	95.0(3)
Veľkosť kryštálu (mm)	0.286 × 0.124 × 0.085
Z	8
a (Å)	27.4449(2)
b (Å)	20.37840(10)
c (Å)	8.0545(3)
α	90
β	90
γ	90
V(Å^3)	4504.72(17)
ρ_{calc}(g/cm^3)	1.8711
Farba	hnedá

Tab. 4 Kryštalografické údaje pre komplex Fe(L[1])(bmsa)(Cl)]

Štruktúrne parametre	**2**
Empirický vzorec	$C_{26}H_{22}Br_2ClFeN_2O_6$
Molárna hmotnosť	709.6 g/mol
Kryštálová sústava	monoklinická
Priestorová mriežka	P 2_1/c
Teplota (K)	94.9(4)
Veľkosť kryštálu (mm)	0.112 × 0.088 × 0.055
Z	4
a (Å)	10.5760(2)
b (Å)	26.6537
c (Å)	9.5532(2)
α	90
β	93.934(2)
γ	90
V(Å^3)	2686.6
ρ_{calc}(g/cm^3)	1.7543
Farba	hnedá

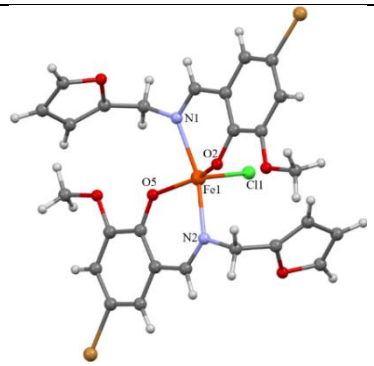
Tab. 5 Kryštalografické údaje pre komplex [Fe(L[2])$_2$(Cl)]



Fe(1)-N(1)	2.101(3)	Fe(1)-Cl(1)	2.293(9)
Fe(1)-O(1)	2.187(2)	Cl(1)-Fe(1)-O(1)	172.9(7)
Fe(1)-O(2)	1.934(2)	O(4)-Fe(1)-O(6)	160.3(1)
Fe(1)-O(4)	2.146(2)	N(1)-Fe(1)-O(2)	162.0(1)

Fe(1)-O(6)	1.902(2)

Tab. 6 Vybrané dĺžky väzieb a uhlov pre komplex (**1**)



Fe(1)-N(1)	2.120	N(1)-Fe(1)-N(1)	159.2
Fe(1)-N(2)	2.139	O(5)-Fe(1)-O(2)	143.8
Fe(1)-O(2)	1.897	Cl(1)-Fe(1)-O(5)	107.2
Fe(1)-O(5)	1.890	Cl(1)-Fe(1)-O(2)	109.02
Fe(1)-Cl(1)	2.233	Cl(1)-Fe(1)-O(1)	98.44
		Cl(1)-Fe(1)-N(2)	102.19

Tab. 7 Vybrané dĺžky väzieb pre komplex (**2**)

Komplex	**TBPY**	**SPY**
$[Fe(L^2)_2(Cl)]$	3.304	**0.782**
	OC	**TPR**
$[Fe^{III}(L^1)(bmsa)(Cl)]$	**1.120**	15.389

Tab. 8 Geometria komplexov (**1**, **2**) pomocou programu SHAPE

Záver

Syntetizovali a izolovali sa dve Schiffove zásady, ktorých štruktúry neboli dosiaľ registrované v CCDC databáze. Pripravené boli dva Fe(III) komplexy s rovnakou nukleritou, ale rôznym koordinačným polyédrom. Pri použití tetrahydrofurfurylamínu viazaného v imínovom ligande sa preferuje tvorba okaédrického komplexu. Ligand obsahujúci furfurylamin uprednostňuje pre zmenu tvorbu pentakoordinovaného komplexu. Hypotéza selektívnej tvorby komplexov vplyvom tetrahydrofurfurylaminu a furfurylaminu sa bude ďalej študovať na širšej vzorke látok.

Poďakovanie

Projektu VEGA 1/0191/22 a Mgr. Erike Samoľovej, PhD. za riešenie štruktúr pomocou monokryštálovej röntgenovej difraktometrie.

Použitá literatúra

[1] SHI, Lei et al. 2008. Synthesis, Characterization, and Antibacterial and Cytotoxic Study of Metal Complexes with Schiff Base Ligands . In *Australian Journal of Chemistry*, vol. 61, no. 4, pp. 288-296.

[2] SHUANG-YAN, Lin et al. 2011. Structure and Magnetic Properties of A μ-Phenoxido-bridged Dinuclear Cobalt(II) Complex. In *Zeitschrift fur Anorganische und Allgemeine Chemie*, vol. 637, no. 6, pp. 720-723.

[3] ZHAO-WEN, Yu et al. 2010. Syntheses and Crystal Structures of 3-Carboxylsalicylidenefurfurylimine And Its Trinuclear Nickle(II) Complex . In *Jiegou Huaxue*, vol. 29, no. 9, pp. 1301-1308.

[4] RAJNÁK, Cyril et. al. 2019. Slow magnetic relaxation in a high-spin pentacoordinate Fe(III) complex. In Chem. Commun., vol. 55, no. 92 , pp. 13868-13871.

[5] RAJNÁK, Cyril et al. 2020. Effect of the Distant Substituent to Slow Magnetic Relaxation of Pentacoordinate Fe(III) Complexes. In *Inorg. Chem.* vol. 59, no. 20, pp. 14871–14878.

[6] C. F. Macrae et al. 2020. CCDC. Mercury 4.0: from visualization to analysis, design and prediction. In J. Appl. Cryst., vol. 53, no. 1, pp. 226-235.

Sekcia

Informatika

Hodnotenie techník na odhaľovanie zmanipulovaných fotografií

Evaluation of techniques for detecting manipulated photos

Ivan Brlej[1] – Miroslav Ölvecký[1]
Školiteľ: Miroslav Ölvecký[1]
[1]Ústav počítačových technológií a informatiky, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
brlej1@ucm.sk, miroslav.olvecky@ucm.sk

Abstrakt

Každý deň sa na internete vymení viac ako 3 miliardy fotiek a 500 hodín videozáznamov. Žijeme vo svete, kde sa digitálne fotografie, videá a hlasové správy stali bežnou súčasťou našej každodennej komunikácie. S nástupom umelej inteligencie a neurónových sieti však rastie aj hrozba manipulácie s týmto digitálnym obsahom.

Technológia Deepfake umožňuje vytvárať realisticky vyzerajúce multimediálne súbory (obrázky a videá), v ktorých politici hovoria veci, ktoré nikdy nepovedali, a celebrity sa správajú spôsobom, ktorý je v rozpore s ich charakterom. Táto technológia môže byť v nesprávnych rukách zneužitá na šírenie dezinformácii.

Príspevok je svojim obsahom zameraný na elimináciu tohto fenoménu. V príspevku sú odprezentované teoretické poznatky o technikách manipulácie multimediálnych súborov, ako aj o technikách využívaných na detekciu manipulácie.

Zároveň sa príspevok zameriava na možnosti detekcie deepfake a odhaľovanie manipulácie. Na základe realizovaných experimentov vieme porovnať dostupné detekčné softvérové nástroje a tak pomôcť aj bežným používateľom v boji proti dezinformáciám.

Kľúčové slová: deepfake, manipulácia multimediálnych súborov, dezinformácie, digitálna forenzná analýza

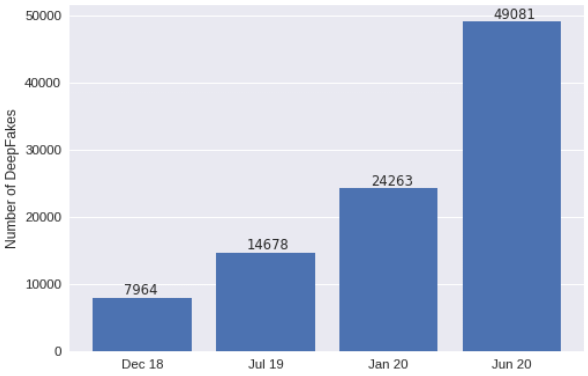
Abstract

Every day, more than 3 billion photos and 500 hours of video recordings are exchanged on the internet. We live in a world where digital photographs, videos, and voice messages have become a common part of our everyday communication. However, with the advent of artificial intelligence and neural networks, there is also a growing threat of manipulation of this digital content. Deepfake technology allows for the creation of realistically looking false videos in which politicians say things they never said, and celebrities behave in ways that contradict their character. This technology can be misused in the wrong hands to spread disinformation. This scientific article focuses on combating this phenomenon. The article presents theoretical insights into techniques for manipulating multimedia files, as well as techniques used for detecting manipulation. Additionally, the article focuses on the possibilities of detecting deepfakes and uncovering manipulation. Based on this research, we can compare available detection software and thus help ordinary users in the fight against misinformation.

Key Words: deepfake, manipulation of multimedia files, disinformation, forensic analysis

Úvod

V súčasnosti digitálne fotografie, videá a hlasové správy sú najpoužívanejšími formami na prenos informácií. Používanie digitálnych médií ako prostriedku pre efektívnu komunikáciu prináša veľa pozitív, avšak so súčasným trendom umelej inteligencie spojenom s rýchlym rozvojom neurónových sieti sa vyskytujú riziká spojené s manipuláciou prenášaných digitálnych súborov. Na obrázku jedna vidíme zvyšujúci sa počet útokov pomocou metódy deepfake.



Obr. 1 Počet deepfake videí identifikovaných online v priebehu rokov 2018 - 2020
Zdroj: [1]

V dôsledku neustáleho nárastu kybernetickej kriminality s použitím manipulácie multimediálnych súborov rastie potreba zvýšenia bezpečnosti proti tejto hrozbe, čo vedie k vylepšeniam detekčných techník a rozvoju vedeckého odvetvia digitálnej forenznej analýzy, ktorá zaisťuje a analyzuje digitálne stopy za účelom vypracovania záverečnej správy alebo znaleckého posudku s cieľom vyriešenia kybernetických zločinov.

Forenzná analýza sa však zaoberá iba prípadmi trestných činov a preto, v príspevku chceme na reálnych experimentoch ukázať ako eliminovať zmanipulované fotografie a tak pomôcť ľudom zistiť čo je reálne a čo nie.

1 Techniky manipulácie fotografií

V súčasnosti existuje veľa techník na manipuláciu fotografií, avšak medzi nimi dominujú Copy-move a Splicing z dôvodu jednoduchej implementácie a náročnej detekcie takto zmanipulovaných fotografií.

1.1 Copy-move

Technológia falošného kopírovania známejšia ako copy-move technológia, slúži na manipuláciu digitálnych fotografií s úmyslom vytvoriť ilúziu viacerých prítomných objektov tým, že časť z pôvodnej fotografie je skopírovaná a vložená na iné miesto do tej istej fotografie.

Copy-move je veľmi jednoduchá na realizáciu a detekcia takto zmanipulovaných médií je náročná na detekciu. Čo potvrdzuje prípad skúšobných výstrelov iránskych rakiet na obrázku dva.



Obr. 2 Ukážka copy-move manipulácie
Zdroj: [2]

Na ľavej strane je skutočná fotografia z výcviku iránskeho vojska a na pravej strane je zmanipulovaná fotografia, kde namiesto troch rakiet je vytvorená ilúzia so štyrmi vystrelenými raketami. Copy-move technológia využitá na skopírovanie existujúcej rakety z originálnej fotografie a následného umiestnenia na inú časť fotografie, vytvorila tak autentickú fotografiu, že viaceré známe média ako napríklad New York Times alebo Los Angeles Time zdieľali zmanipulovanú fotografiu [2].

1.2 Splicing

Metóda spájania známejšia ako splicing je metóda, pri ktorej sa vyberajú časti z viacerých fotografií s cieľom umelo vytvoriť fotografiu, v ktorej sú pospájané rôzne časti z pôvodných fotografií.

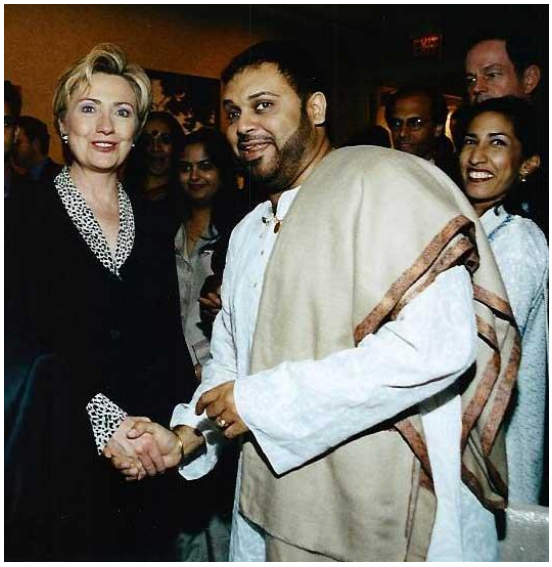
Implementácia je zložitejšia ako pri copy-move, pretože metóda využíva vkladanie objektov z rôznych fotografií, pričom každá z nich disponuje svojimi jedinečnými vizuálnymi vlastnosťami, ako napríklad tiene, šum, sýtosť farieb a podobne [3].
Jedným z najpopulárnejších využití metódy splicing je fotografia Hilary Clinton s Osama Bin Ladenom z roku 2017 zobrazená na treťom obrázku.



Obr. 3 Falošná fotografia Hillary Clinton
Zdroj: [4]

Falošná fotografia sa šírila sociálnymi sieťami a médiami za účelom poškodenia povesti Hilary Clinton a politickej manipulácie vedenej proti jej osobnosti, keďže v tom období kandidovala na prezidentku USA.

Na podvod bola využitá fotografia z roku 2004, kde bola odfotená s hudobníkom Shubhashish Mukherjee. Pôvodná fotografia je zobrazená na štvrtom obrázku.

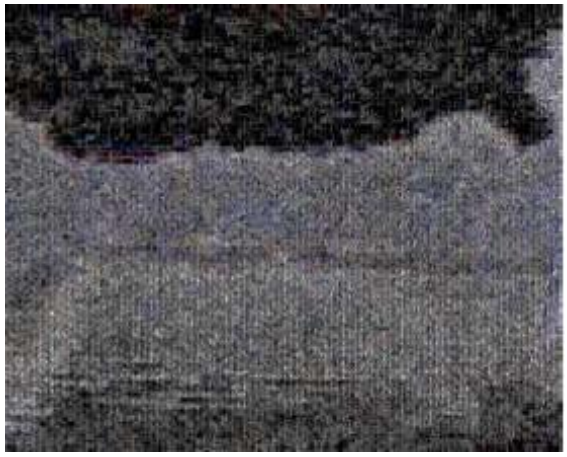


Obr. 4 Skutočná fotografia Hillary Clinton
Zdroj: [4]

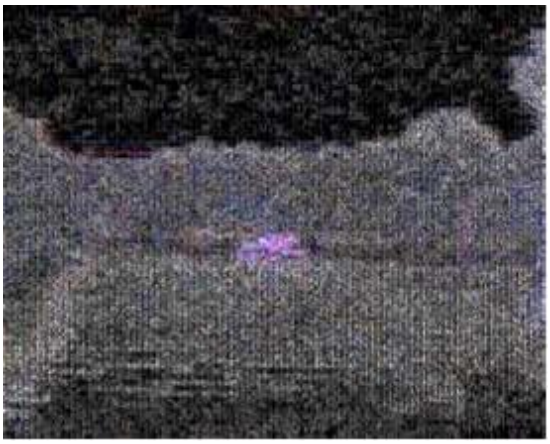
2 Analýza úrovne chýb

Analýza úrovne chýb známejšia pod termínom Error level analysis (ELA) je technika využívaná na detekciu manipulácie s fotografiou porovnávaním chýb vzniknutých pri opakovanej kompresii. Algoritmus využíva fakt, že keď je fotografia uložená viackrát, tak proces kompresie spôsobuje, že rôzne oblasti fotografie majú odlišné úrovne chýb. ELA s pomocou vysokej úrovne kompresie opätovne uloží fotografiu a následne uloženú fotografiu porovná s originálnou.

Rozdiel medzi pôvodnou fotografiou a opätovne uloženou predstavuje množstvo chýb spojených s kompresiou. V neupravených častiach fotografie je úroveň chyb nízka na rozdiel od vysokej úrovne v upravených častiach. Pre zvýraznenie potencionálne zmanipulovaných oblastí využíva algoritmus hodnotu prahu, ktorá je vypočítaná ako percentuálna hodnota maximálnej úrovne chýb. Oblasť, ktorej úroveň chyby je väčšia ako vypočítaná hodnota prahu je zvýraznená pomocou farebného mapovania, ktoré spočíva vo výraznom zafarbení upravených častí fotografie, zatiaľ čo pôvodné častí nie sú farebne zafarbené. Vďaka farebnému mapovaniu aj bežný používateľ dôkaze spozorovať upravené časti fotografie. ELA vychádza z toho, že chyba spôsobená počas kompresie je úmerná rozdielu medzi pôvodným a novým obrázkom [5]. Na obrázku päť vidíme pôvodnú fotografiu po aplikácii ELA. Obrázok šesť zobrazuje upravenú fotografiu po aplikácií ELA, môžeme vidieť v strede fotografie zmenu farby, čo nám ukazuje zmanipulovaný objekt.



Obr. 5 ELA originálnej fotografie
Zdroj: [5]



Obr. 6 ELA zmanipulovanej fotografie
Zdroj: [5]

3 Experimenty na odhalenie deepafake

Zvolené nástroje na detekciu zmanipulovaných fotografií sme testovali pomocou voľne dostupných vedeckých datasetov. Náhodne sme vybrali tridsať zmanipulovaných fotografií pomocou metódy copy-move z datasetu CoMoFoD - Image Database for Copy-Move Forgery Detectio[6] a tridsať náhodných fotografií zmanipulovaných pomocou metódy splicing z datasetu Real and Fake Face Detection [7].

3.1 Nástroje na detekciu deepdake

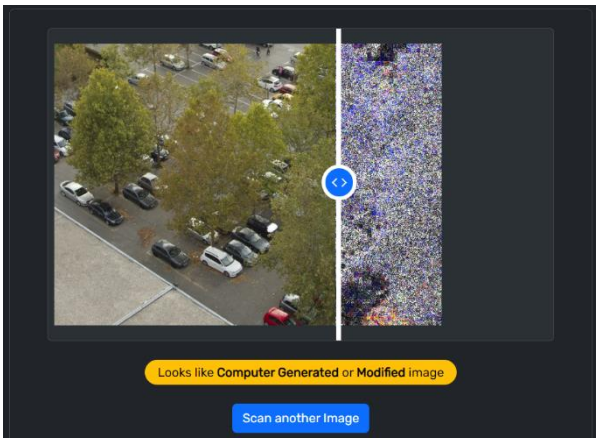
Príspevok je zameraný na pomoc pri eliminácii zmanipulovaných fotografií v každodennom živote, preto sme sa zamerali na otestovanie presnosti voľne dostupných softvérových nástrojov. Porovnávali sme doplnky do prehliadača, webové stránky, ale aj bežné programy na stiahnutie, vďaka čomu má používateľ

variabilitu vo výbere na základe jeho individuálnych preferencií a potrieb.

3.2 FakeImageDetector

FakeImageDetector je voľne dostupné webové sídlo zobrazené na obrázku sedem, ktoré poskytuje detekciu manipulácie fotografií. Analýza prebieha využívaním technológie ELA a analýzou metadát súborov [8].

Pri testovaní softvéru na metódu copy-move správne zanalyzoval deväť fotografií a nesprávne dvadsať jedna, čo nám udáva presnosť na úrovni 30%. V prípade testovania na metódu splicing správne zanalyzoval dvanásť fotografií a nesprávne osemnásť , presnosť softvéru dosiahla 40%.



Obr. 7 Ukážka testovanie FakeImageDetector
Zdroj: Autor

3.3 JPEGsnoop

JPEGsnoop je bezplatná open-source prenosná aplikácia zameraná na detekciu manipulácie súborov vo formáte JPEG. Funguje na báze extrahovania a analyzovania metadát obrázka. Metadáta obsahujú podrobné informácie o vytvorení a všetkých úpravách obrázka a tak JPEGsnoop na základe metadát v prípade zistenia, že bol obrázok upravovaný vyhodnotí ako processed/edited obrázok [9].

Detekcia manipulácie na základe metadát má však veľké nedostatky. V súčasnosti fotografovia, novinári ale aj bežní používatelia väčšinu záberov okamžite upravujú, napríklad orezanie fotografie, aby bol vidieť len dôležitý prvok alebo zmena farebného kontrastu a podobne. Úprava takýmto spôsobom nie je manipulácia, čo však JPEGsnoop nerozpoznáva, výsledky sú preto skreslené.

Pri testovaní aplikácie väčšina súborov bola okamžite označená ako edited.

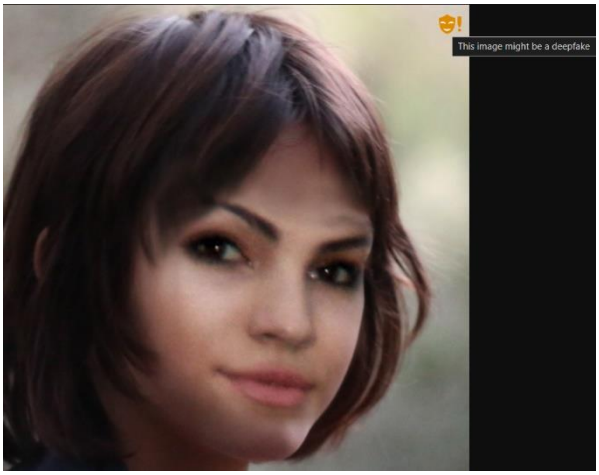
JPEGsnoop nebol vhodný v našom experimente detekciu zmanipulovaných fotografií, avšak v praxi je využiteľný ako doplnok k rozsiahlejšej analýze, napríklad metadáta času alebo zariadenia, na ktorom bola fotografia vytvorená, výrazne môžu pomôcť pri odhaľovaní originálu.

3.4 DeepfakeProof

DeepfakeProof je doplnok v prehliadači Google Chrome vyvinutý firmou DuckDuckGoose s úmyslom pomôcť používateľom s automatickým rýchlym analyzovaním deepfake pri prehliadaní webových stránok. V reálnom čase je doplnok schopný analyzovať deepfake fotografie aj videá [10].

Keďže DeepFakeProof vie analyzovať iba tváre ľudí a pri obrázkoch, kde sú príliš malé alebo absentujú vypisuje chybové hlásenie, rozhodli sme sa tento doplnok testovať na splicing dataset [7].

Softvér správne zanalyzoval päť fotografií a dvadsaťpäť nesprávne, úspešnosť odhalenia zmanipulovanej fotografie dosiahla úroveň 16,67 %. Softvér nefunguje správne. Viackrát sa stalo, že pri opätovnom testovaní toho istého obrázku bol výsledok rôzny. Zároveň treba podotknúť rýchlosť softvéru, kde jeden obrázok testoval v priemere 30 sekúnd, čo je viac ako 3-krát pomalšie oproti softvéru FakeImageDetector. Na obrázku osem vidíme fotografiu z testovania softvéru.



Obr. 8 Ukážka testovania DeepFakeProof
Zdroj: Autor

3.5 Shoop Detect

Shoop Detect je voľne dostupný zdrojový kód, ktorého účelom je pomocou globálneho a lokálneho klasifikátora zanalyzovať fotografiu za účelom zistenia

manipulácie. Fotografiu na analýzu vyberieme pomocou URL, následne je stiahnutá a uložená lokálne.

Fotografia je analyzovaná pomocou globálneho klasifikátora, ktorý je zameraný na celú časť fotografie, určí pravdepodobnosť, že bola fotografia upravená pomocou nástroja Face Aware Liquify (FAL) v programe Photoshop. Globálny klasifikátor využíva model hlbokého učenia natrénovaného na analýzu úprav pomocou funkcie Photoshopu.

Lokálny klasifikátor sa zameriava pomocou hlbokého učenia na konkrétne časti fotografie, kde identifikuje miesta, ktoré sú upravené.

Výsledkom takejto analýzy je pomocou globálneho kvalifikátora pravdepodobnosť s akou je fotografia zmanipulovaná pomocou FAL, zároveň pomocou lokálneho klasifikátora sú určené heatmapy, kde boli vykonané úpravy [11]. Obrázok deväť nám ukazuje pravdepodobnosť, s akou je fotografia zmanipulovaná, zatiaľ čo obrázok desať nám ukazuje heatmapu, kde bola fotografia zmanipulovaná.



Obr. 9 Ukážka výsledku analýzy Shoop Detect
Zdroj: Autor


Obr. 10 Ukážka Heatmap Shoop Detect
Zdroj: Autor

Softvér sme otestovali na splicing datasete, pretože sa zameriava výrazne na detekciu tvár. Priemerne analyzoval fotografiu približne 12,46 sekúnd s priemernou pravdepodobnosťou na manipuláciu 53,06%.

3.6 Surface_crack_image_detection

Ďalším spôsobom na otestovanie manipulácie fotografie je s pomocou využitia modelu surface_crack_image_detection na platforme Hugging Face.

Výsledkom modelu je pravdepodobnosť s akou bola fotografia „crack“ čiže porušená a upravená [12]. Model je veľmi rýchly v priemere analyzoval fotografiu za sekundu, dataset copy-move celkovo vyhodnotil s pravdepodobnosťou 40,41% ako upravované fotografie a dataset splicing 45,98%.

3.7 Výsledky testovania

Na detekciu manipulácie fotografií sme celkovo otestovali päť nástrojov z toho všetky sú open-source a spustiteľné pre používateľov. Väčšinu nástrojov sme otestovali na datasetoch zmanipulovaných fotiek najpoužívanejšími metódami splicing a copy-move o veľkosti tridsať fotografií.

V tabuľke 1 sa nachádza zhrnutie dostupných nástrojov pre detekciu zmanipulovaných obrázkov pomocou metódy splicing.

Tabuľka 1 splicing výsledky testovania

názov nástroja	Správne	Nesprávne	Úspešnosť
FakeImageDetector	12	18	40%
DeepfakeProof	5	25	16,67%
Shoop Detect			53,06%
surface_crack_image_detection			45,98%

Z výsledkov experimentu je vidieť, že najlepšou dostupnou metódou bola shoop detect.

V tabuľke 2 sa nachádza zhrnutie dostupných nástrojov pre detekciu zmanipulovaných obrázkov pomocou metódy copy-move.

Tabuľka 2 copy-move výsledky testovania

názov nástroja	Správne	Nesprávne	Úspešnosť
FakeImageDetector	9	21	30%
DeepfakeProof			
Shoop Detect			
surface_crack_image_detection			40,41%

Z výsledkov experimentu je vidieť, že najlepšou dostupnou metódou bola surface_crack_image_detection.

Záver

V príspevku sme opísali najpoužívanejšie manipulácie fotografií a otestovali sme viaceré dostupné softvérové nástroje na detekciu manipulácie fotografií. Vďaka porovnaniu vieme povedať, že nastroj JPEGsnoop nie je vhodný na analyzovanie zmanipulovaných fotografií.

Podľa výsledkov našich experimentov môžeme považovať nastroj Shoop Detect ako najpresnejší, ktorý okrem pravdepodobnosti ponúka aj užitočné heatmapy. Je dôležite si uvedomiť, že presnosť testovaných softvérov v mnohých prípadoch nie je najvyššia. Preto odporúčame fotografie analyzovať s využitím viacerých softvérov aj s pridaním analýzy metadát, aby výsledky boli presnejšie. Ani testovanie podľa nášho odporúčania nie je úplne presné, slúži ako vhodný ukazovateľ, podľa ktorého sa následne používateľ rozhodne o pravosti danej fotografii.

V prípade väčších znalosti používateľa je možné napríklad pomocou programovacieho jazyku Python vyskúšať dostupné kódy modelov z internetu pre presnejšie výsledky, takéto testovanie je však oveľa náročnejšie a nie je vhodné pre používateľov bez pokročilých programátorských znalostí. Viacerí autori (obrázok 11) využívajúci kombináciu rôznych techník odhaľovania manipulácie obrázkov (KAZE, SIFT, SURF, ORB a pod.) dosahujú v experimentoch oveľa lepšie výsledky. Naše experimenty však ponúkajú ukážku dostupných GUI nástrojov, ktoré môže použiť bežný používateľ aplikovať do obrázkov, u ktorých nie je jasné či sa o jedná o reálny obrázok alebo podvod.

Method	F-Measure (%)
SIFT-Symmetry (Warif et al., 2017)	82.149
AKAZE+SURF (Wang et al., 2018a)	39.343
KAZE+SIFT (Yang et al., 2017)	35.501
ANMS+DAISY (Guo et al., 2013)	31.766
ORB (Zhu et al., 2016)	28.367
Harris+BRISK (Isaac & Wilscy, 2015)	24.711
SIFT (Amerini et al., 2011b)	17.182
SURF (Soni et al., 2019)	13.893

Obr. 11 Ukážka presností iných modelov
Zdroj: [13]

Poďakovanie

Touto cestou by som chcel poďakovať doc. Ing. Jane Jurinovej, PhD. za odbornú pomoc a rady pri vytváraní tohto príspevku.

Použitá literatúra

[1] Patel, Mohil & Gupta, Aaryan & Tanwar, Sudeep & Obaidat, Mohammad. (2020). Trans-DF: A Transfer Learning-based end-to-end Deepfake Detector. 10.1109/ICCCA49541.2020.9250803. [cit. 20.2.2024]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/ publ ication/345162335_Trans-DF_A_Transfer_Learning-based_end-to-end_Deepfake_Detector?_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6Il9kaXJlY3QiLCJwYWdlIjoiX2RpcmVjdCJ9fQ

[2] Ferreira, Sara & Antunes, Mario & Correia, Manuel Eduardo. (2021). Exposing Manipulated Photos and Videos in Digital Forensics Analysis. Journal of Imaging. 7. 102. 10.3390/jimaging7070102. [cit. 20.2.2024]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publi cation/352736685_Exposing_Manipulated_ Photos_and_Videos_in_Digital_Forensics_Analysis

[3] Qureshi, Muhammad & Deriche, Mohamed. (2014). A review on copy move image forgery detection techniques. 2014 IEEE 11th International Multi-Conference on Systems, Signals and Devices, SSD 2014. 1-5. 10.1109/SSD.2014.6808907. [cit. 20.2.2024]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publi cation/269308369_A_review_on_copy_move_ima

ge_forgery_detection_techniques?_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6Il9kaXJlY3QiLCJwYWdlIjoiX2RpcmVjdCJ9fQ
[4] BBC News. “How Tall Is Mount Everest? For Nepal, It’s a Touchy Question.” [Online] [cit. 20.2.2024]. Dostupné z: https://www.bbc.com/news/world-41821923
[5] Raković, Dejan. (2023). Error level analysis (ELA). Tehnika. 78. 445-451. 10.5937/tehnika2304445R. [cit. 20.2.2024]. Dostupné z: https://scindeks-clanci. ceon.rs/data/pdf/0040-2176/2023/0040-21762304445R.pdf
[6] CoMoFoD - Image Database for Copy-Move Forgery Detectio [cit. 20.2.2024]. Dostupné z: https://www.vcl.fer.hr/comofod/download.html
[7] CIPLAB (2019). Real and Fake Face Detection [Online] Dostupné z: https://www.kaggle.com /datasets/ciplab/real-and-fake-face-detection
[8] Fake Image Detector. [Online] [cit. 20.2.2024]. Dostupné z: fakeimagedetector.com
[9] JPEGSnoop [Online] [cit. 20.2.2024]. Dostupné z: https://github.com/ImpulseAdventure/JPEGsnoop
[10] DeepFakeProof [Online] [cit. 20.2.2024]. Dostupné z: https://www.duckduckgoose.ai/deepfakeproof
[11] Shoop Detect [Online] [cit. 29.2.2024]. Dostupné z: https://colab.research.google.com/drive/1AQ0XSKWjzJBhGXXJ0XrA4DckFdv6Ul5N?pli=1#scrollTo=2eYlSfxy-8qe
[12] dima806/surface_crack_image_detection [Online] [cit. 29.2.2024]. Dostupné z: https://huggingface.co/ dima806/surface_crack_image_detection
[13] Dixit, Anuja & Bag, Soumen. (2021). A Fast Technique to Detect Copy-move Image Forgery with Reflection and Non-affine Transformation Attacks. Expert Systems with Applications. 182. 115282. 10.1016/j.eswa.2021.115282. [cit. 02.03.2024]

Aplikácia pre podporu prístupnosti v hre na klavír s využitím rozšírenej reality

An application to support accessibility in piano playing using augmented reality

Peter Hafner[1] – Michal Čerňanský[1]
Školiteľ: Michal Čerňanský[1]
[1]Katedra Ústav počítačových technológií a informatiky, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01, Trnava
hafner1@ucm.sk, micahl.cernansky@ucm.sk

Abstrakt

Príspevok popisuje tvorbu prístupného riešenia alternatívneho sustain pedálu, ktorý sa používa pri hre na klavír. Z riešenia môžu najviac ťažiť ľudia s postihnutím dolných končatín. Práca obsahuje návrh ľudskej interakcie s počítačom a jej implementáciu pre platformu iOS, ktorá implementuje rozšírenú realitu pre rozpoznávanie tváre a taktiež rôzne komunikácie medzi aplikáciou a klavírom. Hlavné časti aplikácie venujúce sa komunikácii implementujú MIDI sieťovú komunikáciu, Bluetooth Low Energy komunikáciu a hosťovanie hudobného nástroja inej aplikácie z AppStore, ktorý je zapojený do audio grafu našej aplikácie. Aplikácia je publikovaná v AppStore a je bezplatne dostupná po celom svete. Práve sa nachádzame vo fáze publikovania aktualizácie, ktorá nadväzuje na získanú spätnú väzbu.

Kľúčové slová: Swift, ARKit, MIDI, AUv3, ľudská interakcia s počítačom.

Abstract

The aim of the thesis was to create an accessible alternative sustain pedal solution for playing the piano, from which people with lower limb disabilities can benefit the most. The work includes the design of human-computer interaction and its implementation for the iOS platform, which implements augmented reality for facial recognition as well as various communications between the application and the piano. The main communicative parts of the application implement MIDI network communication, Bluetooth Low Energy communication, and hosting a musical instrument from another AppStore application, which is integrated into our audio graph. The application is published in the AppStore and is available for free worldwide. We are currently in the phase of publishing an update that follows up on the feedback received.

Key Words: Swift, ARKit, MIDI, AUv3, human-computer interaction

Úvod

Prístupnosť technológie pre používateľov so zdravotným postihnutím je dôležitou súčasťou informatiky, ktorá pomáha začleniť jednotlivcov do každodenného života.

Nás zaujalo využitie technológie pre sprístupnenie kreatívnej činnosti – hre na klavír. Ľudia s postihnutím dolných končatín majú problém s ovládaním klavírneho pedálu. Klasický sustain pedál sa nachádza na podlahe. Jeho funkcionalita spočíva v doznení nôt, ktoré sú hrané počas aktivovaného pedálu. Technika hrania s pedálom umožňuje vytvorenie zvuku, ktorý je bez pedálu nemožné vytvoriť.

Na internete sa nachádza niekoľko alternatívnych riešení, avšak žiadne z nich nie je určené pre širokú verejnosť. Sú to mechanické riešenia, ktoré by si musel každý skonštruovať sám, keďže sériová výroba z dôvodu nízkeho počtu potencionálnych zákazníkov roztrieštených po celom svete nepripadá do úvahy. Riešenie v podobe mobilnej aplikácie sa javí ako najvhodnejší spôsob, ako dostať riešenie k čo najviac používateľom.

Spoločnosť Apple vytvára produkty s ohľadom na ľudí so zdravotným postihnutím tým, že vytvára funkcie prístupnosti v systéme, ale umožňuje aj integráciu prístupnosti pre vývojárov aplikácií [1]. Prístupnosť je jedna z hlavných hodnôt platformy Apple a preto sme sa okrem iného rozhodli vyvinúť natívnu aplikáciu pre iOS a iPadOS s názvom MouthPedal.

1 Analýza problematiky

Pred začatím samotného vývoja sme vykonali analýzu súčasného stavu problematiky. Z dostupných zdrojov sme sa dozvedeli o rôznych prístupoch, ktoré sa pri hre na klavír používajú [2,3]. Prístupy sme porovnali aj spolu s naším konečným riešením za pomoci kľúčových vlastností z pohľadu na používateľský zážitok.

Dostupnosť – riešenie je jednoducho dostupné pre potencionálneho záujemcu.

Diskrétnosť – riešenie je nenápadné z pohľadu poslucháča. To môže dodávať sebavedomie vystupujúcemu (používateľovi).

Samostatnosť – riešenie nevyžaduje druhú osobu.

Voľný pohyb – riešenie umožňuje používateľovi možnosť voľného pohybu torza počas hry.

Tabuľka 1 Porovnanie vlastností

	R1	R2	R3	R4	Mouth Pedal
Dostupnosť	*	*	*	*	*
Diskrétnosť	*	*	*	*	*
Samostatnosť	*	*	*	*	*
Voľný pohyb	*	*	*	*	*

R1 Druhá osoba – používateľ využíva asistenciu druhej osoby vzdelanej v klavírnej teórii, ktorá aktivuje či deaktivuje pedál. Alebo neznalá osoba, ktorá na dohodnuté gesto klaviristu ovláda pedál.

R2 Ústny spínač – používateľ využíva tlak vyvinutý čeľusťou na ústny spínač, ktorý aktivuje mechanizmus pedálu. Druhá možnosť je spínač, ktorý reaguje na fúknutie.

R3 Helma so senzorom – používateľ má na hlave helmu na bicykel, ktorá má v sebe zabudovaný pohybový senzor, ktorý pri naklonení hlavy aktivuje pedál.

R4 Slúchadlový senzor – používateľ má v uchu slúchadlo, ktoré slúži hlavne na uchopenie k hlave používateľa. Používateľ rovnako ako pri R3 náklonom aktivuje pedál.

MouthPedal – naše riešenie. Používateľova tvár je snímaná pomocou kamier. Pri pootvorení úst sa pedál aktivuje.

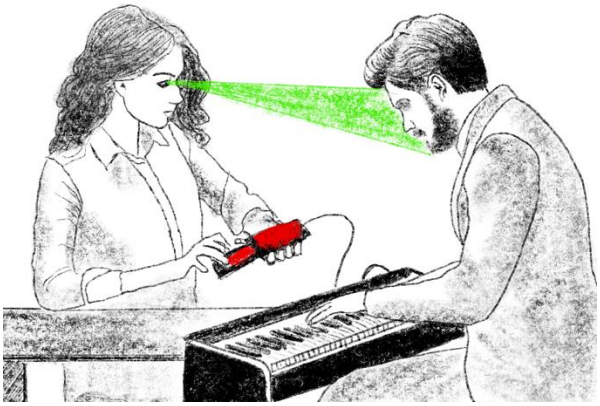
2 Návrh interakcie

Identifikovanie kľúčových vlastností sme využili pri návrhu novej interakcie, ktorú sme následne otestovali nenákladným experimentom.

Hlavnou myšlienkou návrhu je umelé nahradenie druhej osoby z R1 počítačom. Naučiť počítač klavírnu teóriu a každú pieseň nie je reálne a preto sme potrebovali navrhnúť gesto, ktorým by používateľ dal počítaču signál pre aktiváciu pedálu, podobne ako používateľ druhej osobe v R1.

Počítačové videnie dokáže rozpoznávať rôzne časti tela. Pri hre na klavír nepripadá do úvahy ovládanie pomocou rozpoznávania rúk. Ostáva nám teda iba rozpoznávanie tváre. Metódy pre detekciu tváre dokážu rozpoznávať jej rôzne samostatné časti. Ako rozpoznateľné gestá tváre, ktoré dokážu reprezentovať dva stavy (aktivovaný/deaktivovaný pedál) sa vo všeobecnosti ukázali: žmurknutie očami, dvihnutie obočia, otváranie úst, úsmev a náklon hlavy smerom ku zariadeniu.

Pre otestovanie gest sme navrhli nenákladný experiment, ktorý spočíval v asistencii druhej osoby, ktorá sledovala gestá tváre počas hry používateľa a na ich základe aktivovala pedál. Obrázok 1 slúži pre vizualizáciu interakcie.



Obrázok 1 Nenákladný prototyp interakcie

Experiment ukázal, že ako najvhodnejšie riešenie sa javí použitie gesta otvorenia úst, avšak len ak by sme overili schopnosť technológie rozpoznať iba jemné pohyby úst. Náklon hlavy sa taktiež javí ako použiteľné riešenie, avšak nespĺňa vlastnosť voľného pohybu pri hre. Ostatné gestá sa preukázateľne javia ako nevhodné. Porovnanie gest je možné vidieť v tabuľke 2.

Tabuľka 2 Pozorovanie experimentovania s možnými riešeniami

Obočie	Po krátkom čase nepríjemné
Oči	Po krátkom čase nepríjemné a nevhodné, keďže v určitých pasážach skladby by musel mať používateľ zavreté oči – nevhodné pre začiatočníkov.
Ústa	Pri malom pootvorení úst interakcia neprekážala a ani po dlhšom čase hrania. Pôsobí prirodzene a nenápadne.
Úsmev	Nemusí sa zhodovať s emóciou hranej skladby.
Náklon hlavy	Ovplyvňuje prirodzený pohyb torza rovnako ako R3 a R4. Pri frekventovanej aktivácii mierne otravné, avšak použiteľné.

3 Návrh technického riešenia

V tejto kapitole je opísaný výber a overenie technológie využitej pre implementáciu navrhnutej interakcie a komunikácie aplikácie s klavírom.

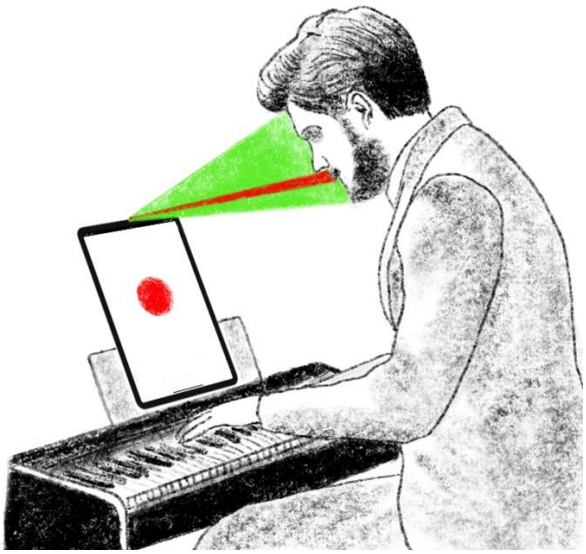
3.1 Návrh technického riešenia interakcie

Najvhodnejšie riešenie sa na základe experimentu ukázalo ovládanie ústami, ktoré musíme technologicky overiť, keďže interakcia vyžaduje jemné rozpoznanie otvorenia úst.

Ako experiment sme navrhli viacero jednoduchých prototypov pre testovanie technológie špecificky pre náš problém. Natívne komponenty dostupné pre vývojárov ponúkajú dve technológie. Rozpoznávanie z obrazu za pomoci Vision[4] a rozpoznávanie tváre pomocou kombinácie TrueDepth kamery a prednej kamery, ktoré je súčasťou rozšírenej reality frameworku ARKit [5].

Zistili sme, že Vision je nespoľahlivé riešenie pre náš problém, ktoré by kvôli svojej tendencii nepravidelne prechádzať cez nastavený prah pre spustenie pedálu mohlo prerušiť želané doznenie nôt. Taktiež obnovovacia frekvencia je tu limitovaná na 30 snímok za sekundu. ARKit riešenie dovoľuje nastaviť snímanie na 60 snímok za sekundu, pričom kamere sekunduje TrueDepth kamera. Tá zrejme svojimi približne 15 snímkami za sekundu stabilizuje merania a preto sme zvolili pokračovanie touto metódou.

Existuje viacero prístupov, ktoré bolo potrebné pre naše riešenie testovať. Porovnali sme odporúčaný vysoko úrovňový prístup pomocou tzv. blendShapes, čo je knižnica pomenovaných koeficientov v ponímaní pohybu špecifických výrazov tváre [6]. Druhá možnosť je pristúpenie k jednotlivému vrcholu na maske tváre. Jeden z vývojárov preskúmal ručne vrcholy masky, aby našiel tie, ktoré patria ústam a medzi ktorými sa nachádza stredný bod pre vrchnú a spodnú peru. [7] Tento prístup nám umožnil sledovať vzdialenosť medzi dvoma bodmi. Prístup rozpoznával jemné pootvorenie úst lepšie než prístup s blendShapes a preto sme ho vybrali ako vhodný pre implementáciu interakcie navrhovaného riešenia.



Obrázok 2 Návrh technického prevedenia interakcie

3.2 Návrh technického riešenia komunikácie

Aby bolo naše technické riešenie kompletné, potrebujeme zabezpečiť možné komunikácie medzi aplikáciou a klavírom. Komunikácie sú vizualizované na obrázku 3.

MIDI Network

Počítače s operačným systémom macOS môžu využívať natívnu možnosť pre komunikáciu medzi MIDI zariadeniami v rámci lokálnej siete. Tento prístup je podporovaný viacerými aplikáciami zameranými na MIDI. Tieto aplikácie sa môžu pripojiť k Mac počítaču pomocou WiFi, alebo kábla a potom sú MIDI správy dostupné pre ľubovoľný DAW (Digital Audio Workstation) [8]. Implementácia takejto komunikácie vyžaduje využitie knižnice CoreMIDI, ktorá umožňuje vytváranie a odosielanie MIDI správ v rámci lokálnej siete [9].

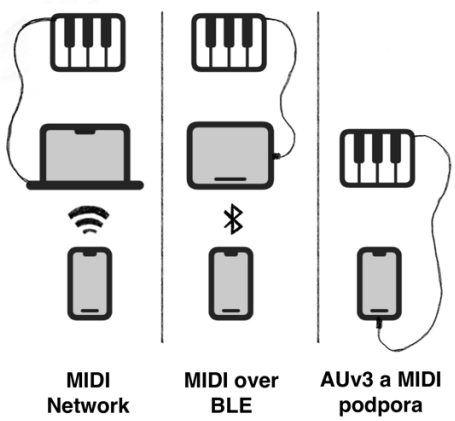
MIDI over BLE

Prístup umožňuje odosielanie a prijímanie MIDI správ prostredníctvom bezdrôtovej technológie Bluetooth Low Energy. Tento prístup umožní využitie aplikácie aj

používateľom, ktorý nemajú prístup k počítaču Mac, keďže okrem týchto počítačov je komunikácia MIDI over BLE natívne dostupná aj na iOS a iPadOS. Vďaka tomu by sme umožnili prepojenie aplikácie napríklad so zariadením iPad, kde bezplatná aplikácia z produkcie Apple s názvom GarageBand[10] umožňuje pripojenie príslušenstva s podporou MIDI over BLE [11]. Na ostatných operačných systémoch ako je Windows, Linux či Android je potrebné nainštalovať potrebné ovládače, či aplikácie. Natívna knižnica CoreBluetooth dovoľuje aplikácii tváriť sa ako BLE príslušenstvo [12].

AUv3

Pre produkciu hudby sa často používajú nielen zariadenia s operačným systémom macOS, ale aj iPadOS, či iOS. Komunita používateľov a vývojárov formovala počas existencie iOS zaujímavú architektúru v dnešnej forme s názvom AUv3, ktorá umožňuje vytvorenie aplikácie, ktorú je možné využiť samostatne, alebo je možné jej nástroje a rozhranie načítať v inej aplikácii [13]. Na túto problematiku sa môžeme pozrieť aj z druhej strany a to implementáciou samotného hosťovania cudzích aplikácií v tej našej. Čiže rovnaká funkcionalita ako pri aplikácii GarageBand, ktorá dokáže AUv3 nástroje načítať a ovládať. Architektúra AUv3 umožňuje pre nami riešený problém vytvoriť samostatné riešenie, ktoré nevyžaduje počítač, či tablet. Pre ovládanie načítaného nástroja hosťovanej aplikácie sa ako vhodné riešenie ukazuje využitie knižnice AudioKit, vďaka ktorej dokážeme prijímať MIDI správy z pripojených MIDI kláves [14].



Obrázok 3 Metódy komunikácie medzi nástrojom a aplikáciou

Všetky tieto prístupy majú určité výhody a nevýhody. Pri výbere záleží na používateľovi a jeho preferenciách. Preto v tejto fáze navrhujeme implementáciu všetkých opisovaných možností komunikácie.

Latencia komunikácie

Uznali sme za vhodné porovnať latenciu riešenia MIDI siete a MIDI over BLE. Vďaka aplikácii MIDI Monitor [15] sme spoľahlivo dokázali odmerať rozdiel v latencii, kde sme sledovali čas prijatia MIDI správy odoslanej z aplikácie. Z našej aplikácie sme naraz poslali správu prostredníctvom oboch komunikácií a v MIDI Monitor aplikácii sme sledovali čas prijatia. Toto porovnanie nám ukázalo, že komunikácia cez MIDI sieť je konštantne rýchlejšia než BLE v priemere o 11 milisekúnd. Preto budeme v aplikácii nabádať používateľa k využitiu MIDI siete pre získanie nižšej latencie, ak má k dispozícii Mac počítač.

```
14:31:38.527  From Sieť Relácia  Control  1  Damper Pedal (Sustain)  127
14:31:38.539  From MouthPedal    Control  1  Damper Pedal (Sustain)  127
14:31:38.561  From Sieť Relácia  Control  1  Damper Pedal (Sustain)  0
14:31:38.569  From MouthPedal    Control  1  Damper Pedal (Sustain)  0
14:31:38.593  From Sieť Relácia  Control  1  Damper Pedal (Sustain)  127
14:31:38.599  From MouthPedal    Control  1  Damper Pedal (Sustain)  127
```

Obrázok 4 Zaznamenávanie času prijatia MIDI správy v aplikácii MIDI Monitor

4 Implementácia riešenia

V tejto kapitole je opísaná implementácia interakcie a komunikácie navrhnutého riešenia. Venujeme sa vybraným častiam kódu, ktoré sú zodpovedné za využitie niektorých nami analyzovaných a overených technológií.

4.1 Implementácia interakcie

Časť kódu na obr. 2 implementuje knižnicu ARKit, ktorá spočíva vo výbere prvej nájdenej kotvy v podobe ľudskej tváre. Následne vyberáme dva vrcholy masky tváre. Pomocou volania metódy *simd_distance()* získame vzdialenosť medzi vrcholmi [16]. Ak je presiahnutý prah otvorenia úst, tak aktivujeme pedál.

```
func session(_ session: ARSession, didUpdate anchors: [ARAnchor]) {
    guard let faceAnchor = anchors.first(where: { $0 is ARFaceAnchor }) as?
        ARFaceAnchor else { return }

    let vertices = faceAnchor.geometry.vertices

    let upperLipPosition = vertices[24]
    let lowerLipPosition = vertices[25]

    let lipsOpenness = simd_distance(upperLipPosition, lowerLipPosition)

    if lipsOpennnes > Float(self.arViewContainer.trashold) {
        // deaktivácia pedálu
        print("SustainOff")
    }else {
        // aktivácia pedálu
        print("SustainOn")
    }
}
```

Obrázok 5 Implementácia ARKit

4.2 Implementácia komunikácie

Pre ukážku sme vybrali metódu načítania AUv3 nástroja, ktorý je následne ovládaný pomocou MIDI klávesov pripojených priamo ku zariadeniu, kde je spustená aplikácia MouthPedal. Prvý krok pri práci s AUv3 komponentami je ich načítanie, počas ktorého sa vyhľadajú všetky AUv3 nástroje z aplikácii tretích strán na zariadení. Kód na obrázku 6 ukazuje, že najprv vytvárame singleton inštanciu triedy *AVAudioUnit ComponentManager*, ktorý slúži ako správca AUv3 nástrojov a efektov [17]. Z dostupných komponentov vyberáme typ *kAudioUnitTypeMusicDevice*, vďaka čomu získame len nástroje [18]. Následne si nástroje uchovávame do poľa typu AUv3Pluging, ktorý sme si definovali, aby sme uchovávali potrebné dáta pre vykreslenie v SwiftUI [19] a taktiež id nástroja, aby sme sa k nemu mohli dostať neskôr pri zapojení nástroja do grafu našej aplikácie. Nástroje obsahujú aj ikonu aplikácie, z ktorej nástroj pochádza, ktorú uchovávame pre zobrazenie používateľovi pre lepšie rozpoznanie.

```
func loadAvailableInstruments() {
    let componentManager = AVAudioUnitComponentManager.shared()
    let components = componentManager.components(matching: .init(componentType: kAudioUnitType_MusicDevice,
                                                                 componentSubType: 0,
                                                                 componentManufacturer: 0,
                                                                 componentFlags: 0,
                                                                 componentFlagsMask: 0))

    DispatchQueue.main.async {
        self.plugins.removeAll()
        for component in components {
            let plugin = AUv3Plugin(id: UUID(),
                                    name: component.name,
                                    manufacturer: component.manufacturerName,
                                    isSelected: false,
                                    image: component.icon)
            self.plugins.append(plugin)
        }
    }
}
```

Obrázok 6 Implementácia získania AUv3 nástrojov

Po používateľovom výbere nástroja ho môžeme použiť vytvorením inštancie vybraného nástroja, aby sme ho mohli zapojiť do audio grafu ako uzol *audioUnit*. Tento uzol následne zapájame do hlavného mixéru [20], ktorý je už predvolene pripojený na výstup. Následne môžeme spustiť audio engine [21] a načítať prvý preset nástroja [22]. Implementácia sa nachádza na obrázku 7.

```
AVAudioUnit.instantiate(with: component.audioComponentDescription, options: []) { [weak self] (audioUnit, error) in

    DispatchQueue.main.async {
        guard let self = self, let audioUnit = audioUnit, error == nil else {
            print("Error instantiating the audio unit: \(error?.localizedDescription ?? "Unknown error")")
            return
        }

        self.selectedInstrument = audioUnit
        self.audioEngine.attach(audioUnit)
        self.audioEngine.connect(audioUnit, to: self.audioEngine.mainMixerNode, format: nil)

        if !self.audioEngine.isRunning {
            do {
                try self.audioEngine.start()
            } catch {
                print("Could not start audio engine: \(error)")
            }
        }

        let auAudioUnit = audioUnit.auAudioUnit
        if let factoryPresets = auAudioUnit.factoryPresets, !factoryPresets.isEmpty {
            auAudioUnit.currentPreset = factoryPresets.first
            print("Factory preset loaded successfully.")
        } else {
            print("No factory presets available or unable to access them.")
        }
```

Obrázok 7 Implementácia zapojenia a načítania AUv3

Aby sme mohli načítaný a zapojený nástroj ovládať, musíme byť schopní spustiť, či zastaviť prehrávanie nôt a taktiež aktivovať, alebo deaktivovať pedál. Chceme ovládať nástroj prostredníctvom pripojeného MIDI klavíru a preto na obrázku 8 ukazujeme implementáciu delegát metódy protokolu MIDIListener knižnice AudioKit. Tieto metódy sú volané pri každej správe prijatej z MIDI zariadenia. Implementovaná je metóda *recievedMIDINoteOn,* z ktorej si vieme prečítať číslo spustenej noty a silu stlačenia, čo je potrebné pre adekvátne spustenie noty načítaného nástroja. Metóda *recievedMIDINoteOff* nám povie, ktorá nota bola na MIDI zariadení vypnutá, vďaka čomu vieme vypnúť danú notu nástroja.

```
func receivedMIDINoteOn(noteNumber: AudioKit.MIDINoteNumber,
                        velocity: AudioKit.MIDIVelocity,
                        channel: AudioKit.MIDIChannel,
                        portID: MIDIUniqueID?,
                        timeStamp: MIDITimeStamp?) {
    //spustenie noty
    print("noteOn")
}

func receivedMIDINoteOff(noteNumber: AudioKit.MIDINoteNumber,
                         velocity: AudioKit.MIDIVelocity,
                         channel: AudioKit.MIDIChannel,
                         portID: MIDIUniqueID?,
                         timeStamp: MIDITimeStamp?) {
    //vypnutie noty
    print("noteOff")
}
```

Obrázok 8 Implementácia delegát metód protokolu MIDIListener

Implementované delegát metódy volajú spustenie a zastavenie noty. Aktiváciu a deaktiváciu pedálu voláme na základe logiky v ARKit interakcii. Hodnota aktivovaného pedálu je 127 a hodnota deaktivovaného pedálu je 0. Tieto volania ovládania nástroja môžeme vidieť na obrázku 9.

```
// spustenie noty nástroja
instrument.startNote(noteNumber, withVelocity: velocity, onChannel: channel)
// zastavenie noty nástroja
instrument.stopNote(noteNumber, onChannel: channel)
// aktivácia pedálu
instrument.sendController(64, withValue: 127, onChannel: channel)
// deaktivácia pedálu
instrument.sendController(64, withValue: 0, onChannel: channel)
```

Obrázok 9 Implementácia ovládania AUv3 nástroja

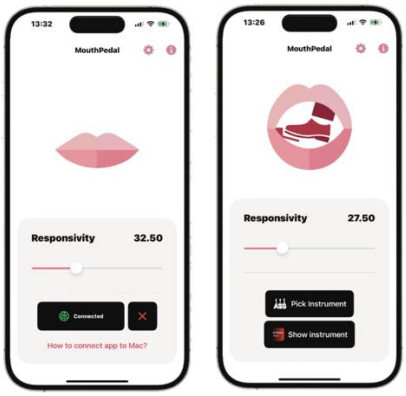
5 Grafické používateľské rozhranie

V tejto kapitole popisujeme, ako sme pristupovali pri návrhu grafického rozhrania aplikácie, ktoré je implementované v SwiftUI.

5.1 Hlavná obrazovka

Na obrázku 10 sa nachádza hlavná obrazovka, ktorej dominantný prvok používateľovi napovedá, či sú jeho ústa pootvorené, alebo zavreté. Podľa otvorenosti úst sa zobrazujú buď zavreté ústa, alebo otvorené ústa, v ktorých je vyobrazený stlačený pedál. Používateľ týmto získava spätnú väzbu, čo posilňuje interakciu

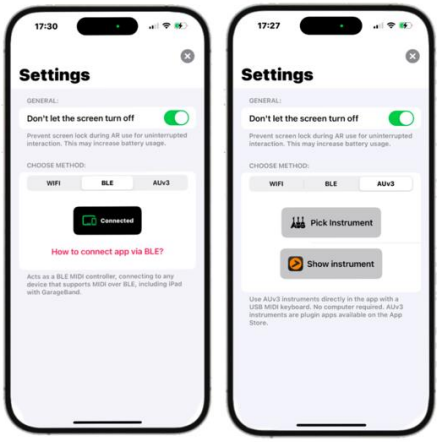
a používateľovu adaptáciu. V dolnej časti obrazovky sa nachádza posuvník, ktorým používateľ ovláda prah otvorenosti úst pre aktiváciu pedálu. Pod posuvníkom sme umiestnili prvok informujúci o statuse pripojenia v kontexte využitia MIDI over BLE a MIDI Network metód. V kontexte AUv3 metódy je v tejto časti zobrazené tlačidlo pre zobrazenie výberu nástroja a tlačidlo pre zobrazenie grafického rozhrania samotného nástroja. V pravej hornej časti obrazovky sa už nachádza len tlačidlo pre zobrazenie popisu o aplikácii a tlačidlo pre zobrazenie nastavení.



Obrázok 10 Hlavná obrazovka

5.1 Obrazovka nastavení aplikácie

Pri navrhnutej interakcii sa používateľ počas samotného používania nedotýka displeja, čo by po čase mohlo spôsobiť zamknutie obrazovky. Preto ponúkame možnosť vypnúť časovač uzamknutia displeju [23]. V ďalšej časti obrazovky sa nachádza možnosť výberu metódy využitia. Pri každej metóde je krátky popis a návod na obsluhu. Nastavenia aplikácie je možné vidieť na obrázku 11.



Obrázok 11 Nastavenia aplikácie

Záver

Pri analýze východiskového stavu sme identifikovali faktory, ktoré vplývajú na používateľský zážitok. Na ich základe sme navrhli experiment, ktorý nám ukázal, že vhodné gesto pre spustenie pedálu je pootvorenie úst.

Pre implementovanie tejto interakcie sa na základe porovnania technológií ukázalo vhodné využiť ARKit rozpoznávanie tváre, konkrétne metóda merania vzdialenosti medzi dvoma vrcholmi masky tváre. Analyzovali a implementovali sme tri metódy prepojenia aplikácie s hudobným nástrojom.

Pri meraní bezdrôtových metód sme zistili, že metóda využívajúca MIDI Network zabezpečuje nižšiu latenciu komunikácie než metóda MIDI over BLE. Implementáciou všetkých navrhnutých metód sme zabezpečili zastrešenie viacerých používateľských scenárov z pohľadu dostupnej techniky používateľa.

Aplikácia je publikovaná a je bezplatne dostupná po celom svete prostredníctvom obchodu AppStore. Momentálne má aplikácia 185 používateľov (marec, 2024).

Diskusia

Aplikácia má potenciál sprístupniť hru na klavír ľuďom so zdravotným postihnutím, ale môže slúžiť aj ostatným ako náhrada za klasický sustain pedál napríklad na cestách. Na internete sa objavilo pár článkov o našej aplikácii, ktoré presvedčili používateľov k stiahnutiu.

Spätná väzba nám potvrdila potrebu integrácie AUv3 architektúry a správnosť interakcie. AUv3 integráciu sme spolu s MDI over BLE metódou zahrnuli v poslednej aktualizácii. Z analytických dát sme sa dozvedeli, že približne 20% kópií beží na zariadení iPad a preto sme optimalizovali grafické rozhranie aj pre toto zariadenie.

V súčasnosti experimentujeme s návrhom a implementáciou ďalšej metódy komunikácie prostredníctvom MicroBitu [24], ku ktorému je cez BLE pripojená aplikácia a doska je zapojená pomocou 6.3mm jack konektoru do klavíru, kde po prijatí správy z aplikácie spína kontakt, čím aktivuje pedál.

V blízkej budúcnosti sa chystáme zdieľať aplikáciu s komunitami iOS hudobníkov a taktiež s komunitami ľudí so zdravotným obmedzením.

Použitá literatúra

[1] APPLE; Accessibility [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://www.apple.com/accessibility/

[2] STEINGRAEBER; Steingraeber pedal systems for wheelchair users [online]. Steingraeber; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://www.steingraeber.de/en/innovationen/pedal-devices-for-pianists-in-wheelchairs/

[3] VUT; A pianist in a wheelchair can also use pedals to play thanks to a unique device [online]. Vut; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://www.vut.cz/en/but/news-f19528/a-pianist-in-a-wheelchair-can-also-use-pedals-to-play-thanks-to-a-unique-device-it-took-the-researchers-from-the-mechatronic-laboratory-half-a-year-to-develop-the-prototype-d193890?aid_redir=1

[4] APPLE; Vision [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/vision/

[5] APPLE; Tracking and Visualizing Faces [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/arkit/arkit_in_ios/content_anchors/tracking_and_visualizing_faces

[6] APPLE; blendShapes [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/arkit/arfaceanchor/2928251-blendshapes

[6] APPLE; blendShapes [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/arkit/arfaceanchor/2928251-blendshapes

[7] STACKOVERFLOW; ARFaceGeometry vertices [online]. StackOverflow; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://stackoverflow.com/questions/53928038/how-can-i-get-the-points-in-face-mesh-like-eye-eyebrow-lip-mouth-nose-using

[8] APPLE; Príručka užívateľa pre apku Nastavenie MIDI audia [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://support.apple.com/sk-sk/guide/audio-midi-setup/ams1012/mac

[9] APPLE; MIDI Networking [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/coremidi/midi_networking

[10] APPSTORE; GarageBand [online]. AppStore; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://apps.apple.com/sk/app/garageband/id408709785?l=sk

[11] APPLE; Používanie Bluetooth MIDI zariadenia s dotykovými nástrojmi v GarageBande pre iPhone [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://support.apple.com/sk-sk/guide/garageband-iphone/chse356a0321/ios

[12] APPLE; CoreBluetooth [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/corebluetooth

[13] APPLE; Audio Unit v3 Plug-Ins [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/audiotoolbox/audio_unit_v3_plug-ins

[14] AUDIOKIT; AudioKit [online]. AudioKit; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://github.com/AudioKit

[15] SNOISE; MIDI Monitor[online]. Snoise; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://www.snoize.com/MIDIMonitor/

[16] APPLE; simd_distance [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/accelerate/2917765-simd_distance

[17] APPLE; AVAudioUnitComponentManager [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/avfaudio/avaudiounitcomponentmanager

[18] APPLE; Audio Unit Types [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/audiotoolbox/1584142-audio_unit_types

[19] APPLE; SwiftUI [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/swiftui/

[20] APPLE; mainMixerNode [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/avfaudio/avaudioengine/1385813-mainmixernode

[21] APPLE; AVAudioEngine [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/avfaudio/avaudioengine

[22] APPLE; AUAudioUnitPreset [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/audiotoolbox/auaudiounitpreset

[23] APPLE; idleTimerDisabled [online]. Apple; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://developer.apple.com/documentation/uikit/uiapplication/1623070-idletimerdisabled
[24] MICROSOFT; MicroBit [online]. Microsoft; 2024 [cit. 25.2. 2024]. Dostupné z: https://microbit.org

Skúmanie stratégii indexovania pre efektívny prístup k dátam v databázovom systéme

Exploring indexing strategies for efficient data access in database management system

Patrik Holeš[1] – Miroslav Beňo[1]
Školiteľ: Miroslav Beňo[1]
[1]Ústav počítačových technológii a informatiky, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
holespato@gmail.com, miroslav.beno@ucm.sk

Abstrakt
V súčasnosti je stále pretrvávajúcim trendom rast objemu dát či už na internete alebo v zariadeniach, ktoré potrebujú dočasne ukladať nejaké nešpecifikované dáta do sekundárnej pamäte. S týmto kontinuálnym rastom je nevyhnutné, aby sa systémy riadenia databáz (DBMS) zameriavali na kľúčovú úlohu a to ako efektívne indexovať tieto dáta. Cieľom je zabezpečiť, aby tieto dáta boli vrátene v čo najkratšom čase po vyžiadaní.

V tomto článku sa zaoberáme skúmaním komplexnejších stratégií indexovania používané na optimalizáciu prístupu k dátam v DBMS. Zameriavame sa na analýzu a následnú implementáciu stromovej štruktúry B+strom v rôznych scenároch použitia, a štruktúrach dát. Okrem samotnej indexácie dát porovnávame ďalšie optimalizačné techniky a to stratégie dočasného ukladania dát tzv. cachovanie, konkrétne Least Recently Used (LRU) a Least Frequently Used (LFU). Následne ich aplikujeme na vlastný DBMS napísaný v jazyku Rust, ktorý taktiež prináša výhody pre tvorbu kritických systémov, ako sú DBMS. Výsledky tejto analýzy môžu poskytnúť užitočné informácie pre vývojárov DBMS snažiacich sa maximalizovať efektivitu pri získavaní dát.

Kľúčové slová: DBMS, B-strom, indexovanie, LRU, LFU.

Abstract
The continuous growth of data volumes, both on the internet and in devices that need to temporarily store unspecified data in secondary memory, poses a significant challenge for database management systems (DBMS). As data volumes continue to expand, it becomes increasingly crucial for DBMS to focus on efficiently indexing this data to ensure rapid retrieval when needed.

This paper explores various indexing strategies employed to optimize data access in DBMS. We analyze and compare the effectiveness of different indexing types, including basic indexing techniques such as hash functions and, more importantly, tree structures, specifically B-trees variations, in different usage scenarios and data structures. In addition to data indexing, we compare other optimization techniques, such as caching strategies least recendly used (LRU), least frequently used (LFU), and apply them to a custom DBMS written in Rust, which also offers advantages for developing critical systems such as DBMS. The results of this analysis can provide valuable insights for DBMS developers striving to maximize data retrieval efficiency.

Key Words: DBMS, B-Tree, indexing, LRU, LFU.

Úvod

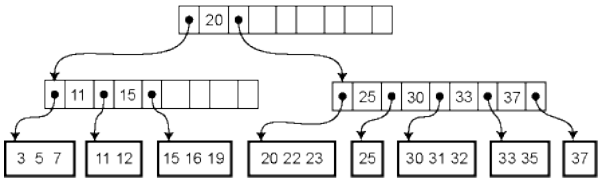
Indexovanie v databázových systémoch je kľúčovou technikou na optimalizáciu získavania, spracovania a následného vrátenia dopytovaných dát. Indexy sú štrukturálne prvky, ktoré umožňujú efektívne vyhľadávanie záznamov v databáze, čím zlepšujú rýchlosť vykonávania dopytov pre vkladanie, mazanie a najmä čítanie týchto záznamov [1]. V súčasnosti existuje mnoho databázových systémov, ktoré využívajú rôzne techniky pre ukladanie indexov. Výber vhodnej techniky indexovania závisí predovšetkým od typu databázy a jej predpokladanému účelu. Vo výskume sa sústredíme na optimalizáciu databázových systémov s primárnym zameraním na čítanie dát, pričom teda nekladieme dôraz na proces zápisu dát. Jednou z bežných metód indexovania pre databázy, kde je priorita čítanie dát, je používanie stromových štruktúr [2]. V súčasnosti existujúce databázové systémy používajú viaceré typy stromových štruktúr, my sme sa zamerali predovšetkým na B-stromy.

B-stromy a ich varianty, napríklad B+stromy, sú často používané v databázových systémoch, pretože umožňujú efektívne vyhľadávanie a aktualizáciu dát v strome s logaritmickou časovou zložitosťou [2]. Problémom pri používaní indexov a stromových štruktúr môže byť ich nesprávne navrhnutie a ich správna údržba pri vkladaní alebo mazaní záznamu. Nesprávne vytvorené indexy môžu viesť k zbytočnému navýšeniu nárokov na pamäť a diskové operácie, čo môže spomaliť výkon systému alebo v najhoršom prípade nefunkčnosť celého databázového systému [2]. Ďalším problémom pri implementácii môže byť aj nadmerná fragmentácia indexov, ktorá môže viesť k násobnému poklesu efektivity vyhľadávania.

Okrem použitia vybranej stromovej štruktúry na dopytovanie existuje ďalšia možnosť ako vyhľadávanie pomocou indexov v databázovom systéme zefektívniť. Vo výskume sme sa zamerali aj na tzv. dočasné ukladanie dát. Teda udržanie záznamu, ktorý bol načítaný zo sekundárnej pamäte, čo najdlhšie v primárnej pamäti. Samozrejme najoptimálnejšie by bolo všetky načítané záznamy ponechať v primárnej pamäti, avšak tu narážame na súčasný problém obmedzenia hardvéru zariadenia, kde pri veľkých množstvách dát nevieme načítať všetky dáta do primárnej pamäte. Preto sme sa zamerali na dočasné ukladanie týchto dát pomocou vybraných techník dočasného ukladania a to LRU a LFU, ktoré sme následne porovnali. Tieto cachovacie algoritmy oproti spomínaným stromovým štruktúram riešia to, ktoré dáta majú v pamäti zostať, a ktoré majú byť vyradené. Oproti tomu stromové štruktúry riešia ako čo najefektívnejšie načítať dáta zo sekundárnej pamäte do primárnej pamäte [3]. Celkovo je správne použitie indexov a stromových štruktúr kľúčové pre dosiahnutie optimálneho výkonu a efektivity pri práci s databázou, a preto je dôležité pochopiť ich fungovanie a správne ich aplikovať v rámci konkrétnej databázovej architektúry.

1 B-strom

Pri implementácii vlastného databázového systému sme sa museli zamyslieť nad tým ako efektívne načítať konkrétne dáta zo sekundárnej pamäte do primárnej pamäte. Po dôkladnej analýze existujúcich databázových systémoch a používaných techník sme sa rozhodli pre náš typ databázy použiť B+strom.



Obr. 1 Indexovanie v B-strome
Zdroj: [3]

B-stromy sú navrhnuté tak, aby umožnili efektívne vyhľadávanie v usporiadaných dátach. Ich vyvážená štruktúra zaručuje, že vyhľadávanie môže byť vykonávané v logaritmickom čase vzhľadom na počet prvkov v strome [2]. To znamená, že aj pre veľké množstvo dát v databáze je čas vyhľadávania pomerne stabilný. Na optimalizáciu nášho riešenia sme sa rozhodli použiť vylepšený typ B-stromu známy ako B+strom. Tento typ B-stromu je založený na klasickom modeli B-stromu, no s pridaním vlastnosti, kde listové uzly ukazujú na svoje susedné listy v strome. Táto vlastnosť umožňuje spojenie listových uzlov do reťazca, čo efektívne zvyšuje rýchlosť vyhľadávania a prístupu k dátam [2].

```
class BPlusTreeNode:
    def __init__(self, leaf=False):
        self.keys = []
        self.children = []
        self.leaf = leaf
        self.next_leaf = None

class BPlusTree:
    def __init__(self, t):
        self.root = BPlusTreeNode(leaf=True)
        self.t = t
```

Obr. 2 Pseudo kód pre vzorovú implementáciu B+stromu

2 Cachovanie

Samotné načítavanie dát zo sekundárnej do primárnej pamäte je kritickou operáciou v mnohých aplikáciách, najmä v tých, ktoré pracujú s veľkým objemom dát. Počet diskových operácií môže byť výrazne znížený udržiavaním nedávno použitých dát v primárnej pamäti pomocou tzv. nahradzovacích politik [4].

Cachovanie inak aj dočasné ukladanie dát je technika, ktorá uchováva nedávno použité dáta v primárnej pamäti, čo umožňuje rýchlejší prístup k nim. Keď aplikácia požiada o určité dáta, sú najskôr vyhľadané vo vyrovnávacej pamäti. Ak sa dáta

nachádzajú vo vyrovnávacej pamäti , nazývame to zásah do cache (cache hit) a dáta sú vrátené aplikácii bez nutnosti načítania zo sekundárnej pamäte. V opačnom prípade, keď sa požadované dáta nenachádzajú vo vyrovnávacej pamäti, hovoríme o chybe cache (cache miss) a aplikácia musí načítať dáta zo sekundárnej pamäte a pridať ich do vyrovnávacej pamäte pre ďalšie použitie. Cieľom cachovania je maximalizovať počet zásahov a minimalizovať počet chýb cache [4]. To vedie k zlepšeniu celkového výkonu aplikácie tým, že sa znižuje čas potrebný na načítavanie dát zo sekundárnej pamäte.

V kontexte udržiavania už načítaných dát v primárnej pamäti sa používajú rôzne techniky ako napríklad (First In First Out) FIFO. Vo výskume sa venujeme viac komplexným algoritmom a to LRU a LFU, keďže FIFO sa všeobecne radí medzi jednoduché nahradzovanie politiky, kde teda oproti LRU a LFU je dokázateľne menej efektívny [5]. Obe nahradzovanie stratégie LRU a LFU vyraďujú dáta, ktoré neboli použité najdlhšie, ale iba v prípade keď je už vyrovnávajúca pamäť úplne plná. To znamená, že dáta, ktoré boli použité najmenej často sa nahradia novými dátami. Avšak medzi LRU a LFU je rozdiel medzi tým ako vyhodnocujú, ktoré dáta sa majú nahradiť, resp. ktoré dáta označia ako najmenej používané, podrobnejšie ich popisujeme nižšie. Týmto spôsobom sa zabezpečí, že vo vyrovnávajúcej pamäti zostanú iba najčastejšie používané dáta, čo prispieva k lepšej využiteľnosti dostupnej pamäti a optimalizácii výkonu aplikácie.

2.1 Least Recently Used (LRU)

LRU je algoritmus, ktorý patrí medzi nahradzovanie politiky používané v aplikáciách na dočasné ukladanie dát. LRU funguje nasledovne: keď je potrebné uvoľniť miesto v pamäti, algoritmus odstraňuje záznamy, ktoré neboli použité najdlhšiu dobu [6]. Existujú rôzne postupy implementácie LRU, my sme zvážili namiesto použitia hašovacej tabuľky, vektor s časovou značkou v každom zázname.

```
struct LRUReplacer {
    page_table: RwLock<Vec<PageMetadata>>
}
```

Obr. 3 Štruktúra LRU pomocou vektora v jazyku Rust

Spomínaná časová značka v každom zaznáme slúži na to, aby sa záznamy navzájom porovnali a následne určili medzi sebou , ktorý bude odstránený a nahradený novým záznamom.

```
pub fn victim(&self) -> Option<PageMetadata> {
    let mut page_table = self.page_table.write();
    page_table.sort_by(|a, b| {
        b.last_accessed_at.cmp(&a.last_accessed_at)
    });
    page_table.pop()
}
```

Obr. 4 Metóda nájdenia a vyradenia záznamu v LRU

2.2 Least Frequently Used (LFU)

LFU je ďalší algoritmus nahradzovania v cache, ktorý sa snaží uvoľňovať miesto v primárnej pamäti tým, že odstraňuje záznamy, ktoré boli najmenej používané. Na rozdiel od LRU, ktorý sleduje čas použitia, LFU sleduje počet čítania toho istého záznamu [7].

```
pub fn victim(&self) -> Option<LFUPageMetadata> {
    let mut page_table = self.page_table.write();
    page_table.sort_by(|a, b| b.frequency.cmp(&a.frequency));
    page_table.pop()
}
```

Obr. 5 Metóda nájdenia a vyradenia záznamu v LFU

LFU oproti LRU teda spočíva v počítaní existujúceho indexu, ktorý ak sa už nachádza v cache, tak hodnota tohto záznamu sa následne zvyšuje o hodnotu jedna. LFU implementácia preto je zvyčajne o niečo komplikovanejšia ako implementácia pri LRU.

```
pub fn unpin(&self, (frame_id, frequency): (usize, usize)) {
    let mut page_table = self.page_table.write();
    page_table.push(LFUPageMetadata::new(frame_id, frequency));
}
```

Obr. 6 Evidovanie frekvencie čítania toho istého indexu

3 Výsledky

Po implementácii B+stromu sme úspešne dosiahli naše očakávane výsledky na optimalizáciu načítavania záznamov zo sekundárnej pamäti. Vytvorenie a efektívne využívanie B+stromu nám umožnilo zlepšiť výkonnosť nášho databázového systému a znížiť čas potrebný na načítavanie dát zo sekundárnej pamäte do primárnej pamäte. Tento prístup nám poskytol spoľahlivý a efektívny mechanizmus pre rýchle a efektívne spracovanie dát, čo má pozitívny vplyv na celkový výkon a výkonnosť našej databázy. Avšak, oproti záznamom bez implementovaného B+stromu sa dátový súbor o niečo pamäťovo zväčšil. Toto pamäťové navýšenie je však zanedbateľné oproti tomu, akú nám priniesla výhodu pri získavaní dát.

Po implementácii LRU cache sme v našej DBMS pozorovali pozoruhodné zlepšenie v rýchlosti získavania záznamov. LRU cache nám poskytla účinný

spôsob, ako optimalizovať časté operácie čítania dát, čo sa prejavilo výrazným znížením časovej náročnosti pri získavaní záznamov.

Testovanie sme vykonali na viacerých dátových setoch a to teda s rozličným počtom záznamov: 100, 1000, 5000. Každé testovacie dáta testujeme na 5 rôznych typoch testu, kde v každom teste vyberáme špecifický index záznamu. Výsledky čítania dát sú v jednotkách mikrosekunda (µs).

Index – Identifikátor záznamu (stĺpec ID)
N – Počet testovacích záznamov v tabuľke

Index záznamu	Testovacie dáta		
	100	**1000**	**5000**
1	148,8	140,4	140,5
100	152,2	137,5	147,1
N/5	144,4	141,8	144,5
N/2	156,5	142,4	154,1
N	140,2	152,2	158,3
Priemerný čas dotazu (µs)	148,42	142,86	148,9

Tab. 1 Vyberanie záznamov bez použitia cachovania

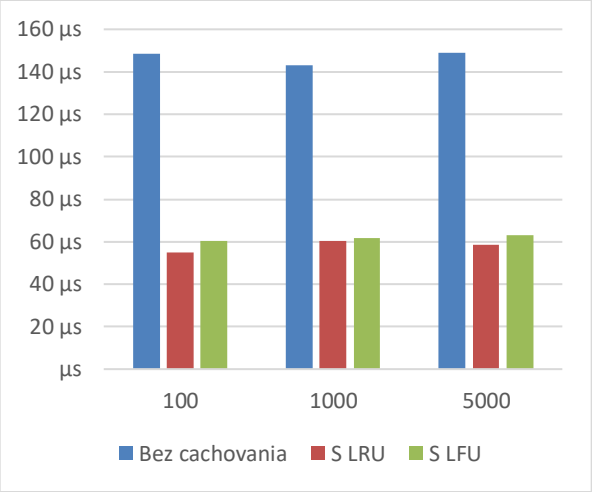
Index záznamu	Testovacie dáta		
	100	**1000**	**5000**
1	57,4	57,2	56,2
100	53,5	61,6	58,7
N/5	56,3	59,9	61,1
N/2	53,9	62,4	57,2
N	54,1	60,5	59,2
Priemerný čas dotazu (µs)	55,04	60,32	58,48

Tab. 2 Vyberanie záznamov s použitím LRU cachovania

Index záznamu	Testovacie dáta		
	100	**1000**	**5000**
1	58,9	58,2	61,2
100	58,1	61,1	63,5
N/5	61,3	62,9	64,2
N/2	62,1	65,1	63,9
N	60,3	62,2	62,2
Priemerný čas dotazu (µs)	60,14	61,9	63

Tab. 3 Vyberanie záznamov s použitím LFU cachovania

V priemere sme dosiahli na testovacích dátach zlepšenie rýchlosti čítania dát pomocou LRU 60,5%, a s použitím LFU 57,96%.



Graf 1 Porovnanie čítania záznamov podľa indexov s použitím cachovacích techník LRU a LFU

Záver

Vo výskume sme potvrdili, že všeobecná implementácia B-stromov výrazne zlepšuje proces výberu záznamov zo sekundárnej pamäte do primárnej pamäte. Tento významný pokrok prispieva k celkovému zrýchleniu spracovania dát v databázových systémoch a zlepšuje celkový výkon systému pri práci s ním. S ohľadom na našu snahu o ďalšie zlepšenia sme si stanovili ďalší cieľ a teda implementáciu ďalších techník pre zrýchlenie celkového času dotazu pre načítavanie dát, konkrétne cachovania. Po implementácii týchto mechanizmov v databázovom systéme sme overili ich naozajstnú účinnosť. Zistili sme, že použitie vyraďovacej politiky LRU a LFU nám výrazne zrýchlilo získavanie dát, ktoré už boli predtým aspoň raz dopytované. Na konkrétnych testoch s testovacími dátami 100, 1000 a 5000 sme zistili, že LRU v priemere je o niečo rýchlejšie ako LFU. Tento výsledok nám poskytuje dôkaz, že správne implementované cache mechanizmy môžu efektívne zlepšiť výkon databázového systému.

Použitá literatúra

[1] Bertino, Elisa et al. 1997. Indexing Techniques for Advanced Database Systems. ISBN: 978-1-4615-6227-6 (eBook).
[2] Comer, Douglas. 1979. The Ubiquitous B-Tree. West Lafayette, Indiana: Purdue University.
[3] Indexovanie v B-Strome: Department of Computer Science at Cornell University [online]. Dostupné z: https://www.cs.cornell.edu/courses/cs3110/2012sp/recitations/rec25-B-trees/rec25.html

[4] Haldar, Sibsankar. 2011. SQLite Database System Design and Implementation. United States of America: Motorola Mobility, Inc.
[5] Donghee, Lee et al. 1999. On the Existence of a Spectrum of Policies that Subsumes the
Least Recently Used (LRU) and Least Frequently Used (LFU) Policies. Korea: Seoul National University.
[6] Chrobak, M, et al. 1999. LRU Is Better than FIFO.
[7] Shah. K, et al. 2010. An O(1) algorithm for implementing the LFU cache eviction scheme. United States Of America: Cornell University.

Power Automate použitie v kancelárii

Power Automate use in the office

Sofiia Holub[1] – Vladimír Siládi[1]
Školiteľ: Vladimír Siládi[1]
[1]Katedra informatiky, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica,
sholub@student.umb.sk, vsiladi@umb.sk

Abstrakt

V kancelárskom prostredí zohráva automatizácia kľúčovú úlohu pri zvyšovaní efektívnosti a optimalizácii pracovných postupov. V tomto článku skúmame vplyv implementácie Power Automate na produktivitu a prevádzkovú efektívnosť organizácií. Power Automate poskytuje súbor nástrojov na vytváranie automatizovaných pracovných postupov, ktoré skracujú čas strávený rutinnými úlohami a zlepšujú kvalitu operácií. V procese vytvárania procesov boli využité kombinácie metód: šablóny, vytváranie od základu a integrácia. Na začiatku sme preskúmali dostupné šablóny v Power Automate, ktoré poskytujú predefinované riešenia pre bežné pracovné postupy. Ďalším krokom bolo vytvorenie vlastnej šablóny od základov. Pre maximalizovanie efektivity a prístup k údajom sme integrovali Power Automate s ďalšími aplikáciami a službami. Cieľom bolo demonštrovať to, ako používanie tohto nástroja vedie k znižovaniu času potrebného na ručné úlohy a zvyšovaniu úrovne automatizácie pracovných procesov. Ďalším cieľom bolo taktiež ukázať možnosti šablón Power Automate a taktiež vytvoriť nové automatizované procesy pre zamestnancov a používateľov počítačov. Výsledky naznačujú, že Power Automate môže posilniť efektivitu v kancelárskom prostredí a zlepšiť produktivitu zamestnancov.

Kľúčové slová: automatizácia, Power Automate, RPA, BPA.

Abstract

In an office environment, automation plays a key role in increasing efficiency and optimising workflows. In this article, I examine the impact of implementing Power Automate on the productivity and operational efficiency of organizations. Power Automate provides a set of tools for creating automated workflows that reduce time spent on routine tasks and improve the quality of operations. A combination of methods were used in the process of creating the processes: templates, building from the ground up, and integration. Initially, I reviewed the available templates in Power Automate that provide predefined solutions for common workflows. The next step was to create a custom template from scratch. To maximize efficiency and access to data, I integrated Power Automate with other applications and services. The goal was to demonstrate how using this tool leads to a reduction in the time required for manual tasks and an increase in the level of workflow automation. Another goal was also to show the capabilities of Power Automate templates and also to create new automated processes for employees and computer users. The results suggest that Power Automate can enhance efficiency in the office environment and improve employee productivity.

Key Words: automation, Power Automate, RPA, BPA.

Úvod

V dnešnom svete, kde sú rýchlosť, efektívnosť a presnosť kľúčovými faktormi v kancelárskom prostredí, sa automatizácia podnikových procesov stáva neoddeliteľnou súčasťou pri každodennej práci firiem. Bez moderných systémov spracovania údajov si len ťažko možno predstaviť pokročilé výrobné technológie, ekonomické riadenie na všetkých jeho úrovniach, vedecký výskum, vzdelávanie, vydavateľskú činnosť či fungovanie masmédií. Jedným z popredných nástrojov v tejto oblasti je Power Automate - pokročilá platforma vytvorená spoločnosťou Microsoft Corporation.

Tento výskum sa zameriava na štúdium a použitie Power Automate na automatizáciu úloh v kancelárskom prostredí. Osobitná pozornosť sa venuje analýze použiteľnosti tohto nástroja na optimalizáciu podnikových procesov, ako aj posúdenie potenciálneho zlepšenia efektívnosti a kvality práce zamestnancov.

Cieľom tohto výskumu je určiť potenciál Power Automate pri automatizácii kľúčových podnikových procesov, ako aj jeho využitie pri zvýšení produktivity zamestnancov. V práci budú predstavené teoretické a praktické aspekty použitia tohto nástroja v podniku, a taktiež v nej budú posúdené praktické príklady jeho využitia.

Čiastkové ciele práce v súvislosti so stanoveným cieľom sú:

1. Definovať pojem automatizácia.
2. Uviesť výhody a nevýhody platformy Power Automate.
3. Zistiť možnosti aplikácie Power Automate, rozobrať pripravené šablóny v súvislosti s implementáciou v práci.
4. Navrhnúť a vytvoriť vlastné šablóny.

V úvode práce rozoberieme pojem automatizácia, ktorého definícia poskytne základný teoretický rámec pre pochopenie automatizácie a jej významu v kontexte pracovných prostredí. Zameriame sa na to, čo je automatizácia, prečo je dôležitá a aké ciele sa s ňou spájajú; ako aj na rôzne druhy automatizácie, ktoré môžu byť využité v rôznych oblastiach podnikania. Pozrieme sa bližšie na to, aký prínos bude mať automatizácia vo firme a aké riziká nám hrozia. Taktiež, sa zameriame na vhodné situácie a oblasti, kedy a kde je najlepšie využiť Power Automate, ako aj na jeho obmedzenia a riziká pri využívaní automatizácie, a na čo by sme si mali dávať pozor pri práci s ňou. Okrem toho, preskúmame možnosti integrácie aplikácií a nástrojov, čím poskytneme komplexný prehľad o Power Automate. Pozrieme sa na pripravené šablóny na používanie v aplikácii Power Automate.

1 Automatizácia a pojmy s ňou spojené

Proces automatizácie technologických procesov si, podobne ako iné oblasti vedeckého poznania, vyžaduje jasné a presné vymedzenie kľúčových pojmov. To je nevyhnutné na zabezpečenie zjednotenia výkladu podstaty skúmaných javov, riešených úloh a vznikajúcich problémov.

V dnešnej dobe, kedy je dôležité zvládať čoraz zložitejšie úlohy a rýchlo reagovať na požiadavky trhu, je automatizácia neodmysliteľným nástrojom pre konkurencieschopnosť a úspech organizácií. Pojem „automatizácia“ pochádza z gréckeho slova „automatos“, čo v preklade znamená „samohybný“. V kontexte našej štúdie nepovažujeme „automatizáciu“ za jednoduchý preklad gréckeho termínu, ale skôr za operáciu výrobného procesu, v ktorom sa všetky kroky, vrátane riadenia procesu, vykonávajú bez priameho zásahu človeka. Človek iba nastavuje zariadenia a monitoruje ich fungovanie. Automatizácia, ako koncept, predstavuje proces nahradenia manuálnych činností a opakujúcich sa úloh automatizovanými postupmi a technológiami. Tento mechanizmus prináša významné zmeny v pracovných prostrediach, ponúkajúc zvýšenú efektivitu, presnosť a rýchlosť výkonu úloh.

Automatizácia v kancelárii neslúži na nahradenie existujúceho systému práce, ale na jeho doplnenie a zlepšenie. Spoločné využívanie umožňuje racionálne automatizovať pracovnú silu a zvýšiť jej efektivitu.

Ciele automatizácie biznis procesov (BPA):

1. Zlepšenie výkonnosti a efektívnosti práce:

Implementácia platformy automatizácie umožňuje eliminovať chyby a zefektívniť pracovné procesy. Nižšia chybovosť vedie k vyššej výkonnosti a efektivite, keď sa zbavíme neefektívnych ručných úloh a zvýšime rýchlosť vykonávania zložitejších podnikových procesov, ktoré zahŕňajú interakciu medzi oddeleniami a zamestnancami po celej organizácii.

2. Zníženie času a nákladov na vykonávanie úloh:

Automatizácia vedie k zvýšeniu zisku a zníženiu nákladov na operácie, najmä v oddeleniach so zastaralými papierovými procesmi. Procesy sa vykonávajú rýchlejšie, čo znamená, že sa minie menej času a finančných prostriedkov na získanie potrebných zdrojov. To umožňuje zamestnancom venovať sa dôležitejším úlohám.

3. Jednoduchšie riadenie údajov a dokumentov:

Manuálne vykonávané operácie môžu spôsobiť stratu dôležitých informácií a dokumentov. Automatizácia procesov umožňuje centralizovať prácu s dokumentmi a údajmi, čo uľahčuje ich organizovanie, vyhľadávanie a riadenie.

4. Zvýšená transparentnosť a viditeľnosť:

Používanie automatizačných platforiem zabezpečuje dodržiavanie firemných politík a zvyšuje transparentnosť pracovných procesov. Tieto riešenia tiež zaznamenávajú dáta, vytvárajú správy a analýzy, čo umožňuje efektívne rozhodovanie na základe aktuálnych informácií.

5. Štandardizácia procesov a zabezpečenie dodržiavania požiadaviek:

Automatizácia procesov zabezpečuje dodržiavanie pravidiel o tom, kto môže meniť alebo aktualizovať dokumenty. Vďaka tomu je možné zabezpečiť, aby sa procesy vykonávali na úrovni systému, čo eliminuje riziko chýb a zaručuje, že informácie sa dostanú k správnym odborníkom v správnom čase.

6. Zlepšenie spokojnosti zamestnancov a zákazníkov:

Implementácia automatizačných riešení umožňuje zamestnancom efektívne a bezchybne vykonávať mnohé denné úlohy, čo prispieva k ich väčšej spokojnosti. Rýchlejšie schvaľovanie návrhov od manažérov dáva zamestnancom príležitosť zamerať sa

na dôležitejšie projekty, čo zvyšuje ich motiváciu a podporuje inovácie. Výhody pocítia aj klienti, ktorí získavajú presnejšie a jednotné údaje, čo zlepšuje ich spokojnosť s konečným produktom alebo výsledkom. [1]

2 Power Automate

Power Automate je platforma RPA (Robotic Process Automation) od spoločnosti Microsoft, ktorá pomáha vytvárať automatizované pracovné postupy, automatizuje rutinné úlohy a procesy, čo nám pomáha šetriť čas a teraz ich nemusíme vykonávať manuálne. Power Automate je k dispozícii vo dvoch verziách: prvá je dostupná cez webový prehliadač, a druhá je štandardná verzia určená na inštaláciu pre lokálny počítač. Podporuje funkciu No Code - Low Code authoring a dokáže spúšťať skripty ako PowerShell a Python. Tieto možnosti sú určené na spustenie na desktop machine pomocou aplikácie Power Automate Desktop.

Možnosti, ktoré nám poskytuje Power Automate:

- Automatizácia každodenných činností.

Napríklad, každý piatok musíme poslať správu, v ktorej sa dozvieme, koľko máme v danom týždni nesplnených úloh. Pred využitím automatizácie zabralo vypracovanie a odoslanie tejto správy danej osobe asi hodinu, možno viac, ale v súčasnosti to robí Power Automate podľa plánu každý piatok na pozadí, bez akejkoľvek ľudskej spoluúčasti.

- Automatizovanie oznámenií.

Platforma napríklad upozorní zamestnanca, že existuje úloha, ktorá čaká na jeho potvrdenie alebo zamietnutie. Keď sa osoba rozhodne, potvrdenie odošle do mailu alebo na iné miesto oznámenia.

- Základné integrácie.

Môžeme vykonať jednosmernú a obojsmernú integráciu.

- Jednoduché používanie mnohých externých API.

Výhodou tohto prístupu je, že bez znalosti rozhrania API a služby SharePoint máme možnosť vziať šablóny, pridať prihlasovacie meno a heslo, vytvoriť pripojenie a môžeme pracovať so súbormi v službe SharePoint.

- Prenos údajov.

Situácie, v ktorých je najlepšie použiť Power Automate:

1. Sekvenčné procesy.

Využíva sa v procesoch, ktoré prebiehajú sekvenčne, a teda v určitom poradí. Najprv sa napríklad vykoná jeden blok, potom druhý blok a až potom tretí blok.

2. Základné riešenia (Basic solutions).

Je to súbor nastavení a komponentov, ktoré umožňujú používateľovi vytvárať a spravovať procesy automatizácie. Základné riešenia sa používajú na organizáciu a správu pracovných postupov a na vytváranie vlastných aplikácií a správ. Používateľ si ho môže ľahko prispôsobiť bez potreby rozsiahlych znalostí programovania.

3. Prototypy.

Keď zamestnanec potrebuje ukázať klientovi možnosti integrácie rozúčtovania s inými systémami a ukázať, ako to funguje v skutočnosti, môže použiť Power Automate.

4. Procesy na pozadí (Background processes).

V prípadoch, keď je potrebné spúšťať procesy automaticky, bez zásahu používateľa. Tieto procesy môžu byť naplánované alebo spúšťané ako reakcia na udalosti.

5. Malý rozpočet a/alebo obmedzený čas.

Využíva sa aj v prípade malých rozpočtov a obmedzeného času, pretože flow poskytuje hotové šablóny, ktoré môžeme okamžite implementovať.

Výhody Power Automate:

1. Jednoduché vytváranie automatizovaných tokov práce: Power Automate poskytuje intuitívne prostredie, v ktorom môžete jednoducho vytvárať a prispôsobovať automatizované procesy pomocou grafického rozhrania bez nutnosti zložitého kódovania.

2. Široká integrácia s rôznymi aplikáciami a službami: Power Automate umožňuje jednoduché integrovanie s mnohými populárnymi aplikáciami a službami, vrátane Microsoft Office 365, SharePoint, Outlook, Google Drive, Dropbox a ďalšími.

3. Možnosť automatizácie opakujúcich sa úloh: Pomocou Power Automate môžeme ľahko automatizovať opakujúce sa úlohy, čo nám ušetrí čas a znižuje riziko chýb spojených s manuálnymi postupmi.

4. Flexibilita a prispôsobiteľnosť: Power Automate ponúka rôzne možnosti prispôsobenia tokov práce podľa našich potrieb, vrátane možnosti pridávania podmienok, vetvenia, slučiek a ďalších funkcií.

5. Centrálna správa tokov práce: Vďaka centrálnej správe v Power Automate môžeme ľahko sledovať a spravovať všetky svoje automatizované procesy z jedného miesta.

6. Zlepšená efektivita a produktivita: Implementácia Power Automate môže viesť k zvýšeniu efektivity a produktivity tímov tým, že odstraňuje ručné úlohy a umožňuje zamestnancom viac sa sústrediť na kľúčové body.

7. Podpora pre spoluprácu a integráciu tímov: Power Automate umožňuje jednoduchú spoluprácu medzi členmi tímu a integráciu s ďalšími nástrojmi pre spoluprácu, čo zlepšuje komunikáciu a koordináciu práce v tíme.

Nevýhody Power Automate:

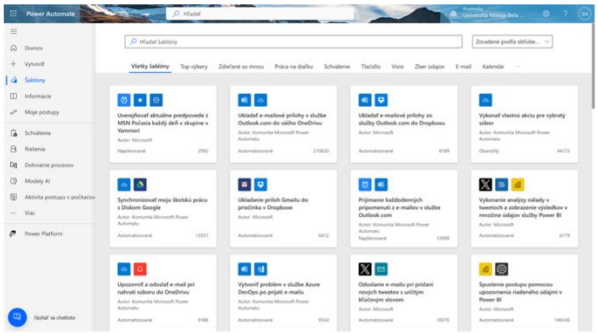
- Zložité pracovné postupy výrazne ovplyvňujú výkon programu.
- Power Automate umožňuje iba 250 akcií v jednom pracovnom postupe.
- Maximálna frekvencia toku pre bezplatný plán je 15 min; pre app-based plán to je 1 min.
- Nemožnosť publikovania v obchode Windows Store, App Store alebo Google Play.
- Nie je možné integrovať JavaScript/C# do formulárov PowerApps.
- Nemožno zdieľať s účtom mimo vášho obchodného tímu.

Existujú určité riziká spojené s automatizáciou:

- Vyžaduje sa vysoká počiatočná investícia pre zavedenie automatizácie.
- Je potrebné mať k dispozícii špecializovaných pracovníkov a je taktiež zvyšovať úroveň kvalifikácie zamestnancov.
- Technická zložitosť výrobných a riadiacich zariadení môže byť prekážkou.
- Zamestnanci sa musia učiť nové veci, čo môže byť spojené s neochotou.
- Operátori môžu mať nedôveru voči automatickým zariadeniam.
- Zamestnanci môžu mať obavy zo straty zamestnania.[2]

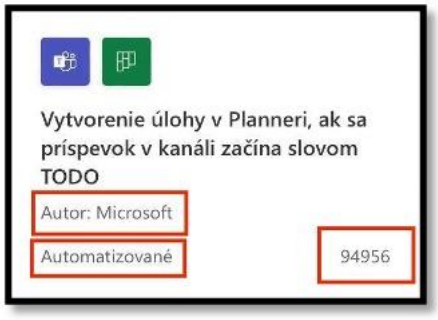
2.1 Šablóny v Power Automate

Šablóny v Power Automate sú ako kľúč, ktorý otvára dvere k efektívnemu a rýchlemu nasadeniu automatizácie. Sú to v podstate hotové vzory automatizovaných procesov, ktoré môžu byť ľahko prispôsobené podľa konkrétnych potrieb a požiadaviek používateľa. Tieto šablóny ponúkajú už existujúce riešenia pre bežné pracovné úlohy a tiež aj procesy. To umožňuje rýchle a efektívne zavedenie automatizácie bez potreby vytvárania procesu od základov. Počet šablón sa pravidelne mení v dôsledku neustáleho pridávania nových aktualizácií. V hornej časti obrázku č.1 môžeme vidieť už zoradené šablóny podľa tém.

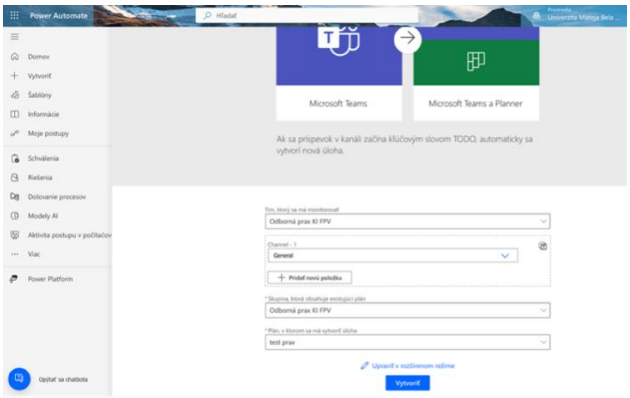


Obr. 1 Šablóny podľa tém.

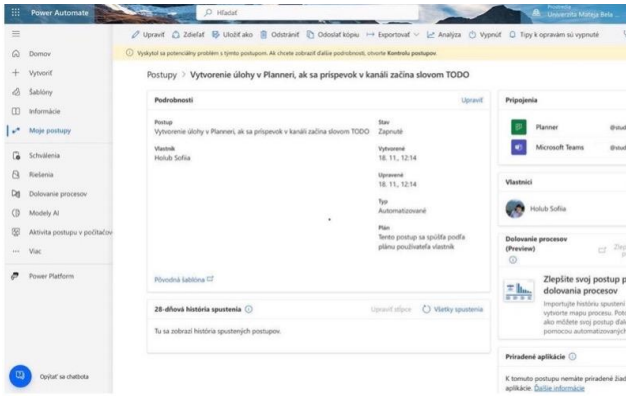
Z navrhovaných šablón sme vybrali tú, ktorá nám najviac vyhovuje. V šablóne môžeme zistiť informácie, ako sú: názov, autor, typ procesu a počet používateľov, ktorí ho používajú, ako je znázornené aj na obrázku č.2 Pri vytváraní procesu sa budeme musieť prihlásiť do svojho konta. V ďalšom okne, ktoré sa zobrazí, musíme vyplniť základné informácie (pozrite obrázok 3). Po definovaní všetkých požadovaných prvkov klikneme na tlačidlo *Vytvoriť pracovný postup*. Po krátkom čase spracovania sa načíta stránka s ovládaním pracovného postupu. Kontrolná stránka poskytuje prostriedky na úpravu, prenos, vypnutie a odstránenie pracovného postupu. Obrázok č. 4 nám znázorňuje už fungujúci spustený proces. Po vytvorení pracovného postupu sa zmení stav na Aktívny a je uvedený na paneli pod názvom „Moje postupy“. Implementácia tohto konkrétneho procesu trvá vypracovať 2 minúty.



Obr. 2 Informácia o šablóne.



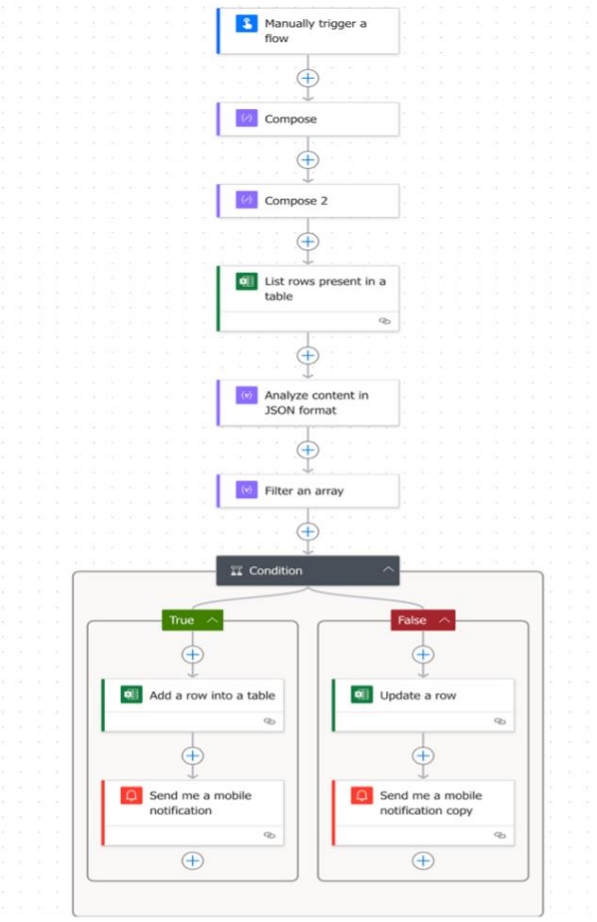
Obr. 3 Doplnenie údajov v šablóne.



Obr. 4 Vytvorený šablón.

2.2 Vytvorenie vlastného toku. Dochádzka do práce.

Pri vytváraní vlastného toku v Power Automate si ukážeme príklad, kde je jeho hlavnou úlohou zaznamenávať v tabuľke Excel pracovnú dochádzku. Logika tohto procesu bude taká, že po príchode do práce sa kliknutím na spustenie procesu zaznamená čas začiatku práce, a pri skončení pracovnej doby sa v tomto bode zaznamená čas jej ukončenia. Tento údaj bude oznámený na e-mail zamestnanca. V riadku „ItemId“ v tabuľke bude automaticky uvedený e-mail zamestnanca, ktorý proces začal. Je tiež možné získať informácie o dochádzke na e-mail vo forme tabuľky. Bolo by vhodné to urobiť na konci mesiaca, aby bolo možné vytvoriť si správu. Takto vyzerá dokončený proces, ktorý je vyznačený na obrázku č.5 a tabuľka, do ktorej sa pôvodné údaje zapísali a ktorá je znázornená na obrázku č.6.



Obr. 5 Postup procesa.

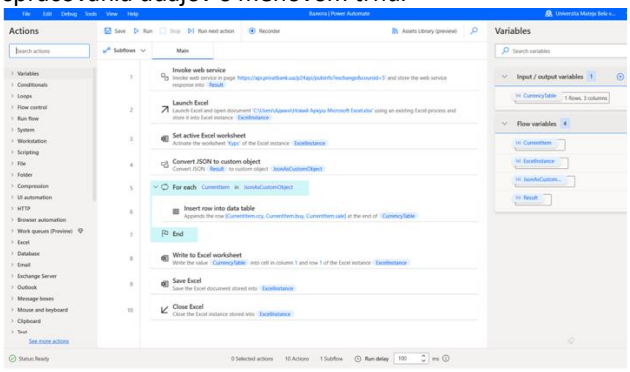
	A	B	C	D	E	F
1	Email	Date	TimeStart	TimeEnd	ItemId	
2	sholub@stud	2024-02-09	08:47:29	08:50:58	sholub@student.umb.sk	2024-02-09
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						

Obr. 6 Excel tabuľka.

2.3 Vytvorenie vlastného toku v Power Automate Desktop .

Pozrime sa na ďalší príklad použitia procesu v aplikácii Power Automate Desktop, ktorý je znázornení na obrázku č.7. Predpokladajme, že chceme nastaviť automatické čítanie okamžitého výmenného kurzu meny z ukrajinskej banky „PrivatBank“ a zaznamenávať tieto informácie do tabuľky, ktorá je označená na obrázku č.8. Tieto údaje potom môžu zamestnanci banky využívať na operatívne sledovanie

aktuálneho kurzu meny a prijímanie príslušných rozhodnutí. Zamestnanci banky môžu tieto údaje použiť napríklad na analýzu a prognózu zmien na menovom trhu, čo im umožní efektívnejšie riadiť menové operácie a poskytovať klientom aktuálne informácie o menových kurzoch. Takýto proces automatizácie pomôže zamestnancom banky ušetriť čas a úsilie, ako aj zvýšiť efektívnosť a presnosť spracovania údajov o menovom trhu.



Obr.7 Postup procesu v Power Automate Desktop.

	A	B	C	D
1	Currenty	Purchase	Sale	
2	EUR	40.9	41.9	
3	USD	37.85	38.45	
4				
5				
6				
7				

Obr.8 Výsledok procesa.

Záver

Záver tejto štúdie ukazuje, že implementácia Power Automate môže viesť k výraznému zlepšeniu efektivity a produktivity v kancelárskom prostredí. Zistenia zahŕňajú, že automatizácia pracovných procesov pomocou Power Automate má potenciál výrazne znižovať čas strávený na ručných úlohách a zvyšovať úroveň automatizácie. Využitie Power Automate umožňuje zefektívnenie opakujúcich sa úloh a organizáciu pracovných postupov. Prepojenie rôznych aplikácií a systémov pomocou Power Automate prispieva k lepšej koordinácii a správe informácií v rámci organizácie. Možnosť vytvárať vlastné šablóny a prispôsobovať tokom práce podľa špecifických potrieb organizácie alebo tímu.

Poďakovanie

Rada by som sa úprimne poďakovala školiteľovi Vladimírovi Siládimu za jeho cenné vedenie, podporu a odborné rady počas pracovania na tejto práci. Jeho znalosti a ochota pomáhať mi veľmi pomohli a posunuli ma vpred. Týmto by som tiež poďakovala Ústavu automatizácie a komunikácie UMB za poskytnutie témy, ktorá ma inšpirovala k vykonaniu tejto práce. Taktiež by som chcela vyjadriť vďaku svojim rodičom za ich neustálu podporu počas celého môjho štúdia. Ich podpora mi dodávala silu a inšpiráciu v každom kroku mojej cesty.

Použitá literatúra

[1] Infogram: Microsoft Power Automate [online]. Infogram: 2022 [cit. 2022]. Dostupné z: https://powerautomate.microsoft.com/ru-ru/business-process-automation-benefits/

[2] KAVAN, Michal, 2002. Vyrobni a provozni management. 1. vyd. Praha: Grada, 424 s. ISBN 80- 247-0199-5

Analýza bezpečnosti SO-HO smerovačov v sieti IPv6

Security analysis of SO-HO routers in an IPv6 network

Dominik Hrinkino[1] – Ladislav Huraj[1]
Školiteľ: Ladislav Huraj[1]
[1]Ústav počítačových technológií a informatiky, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
hrinkino1@ucm.sk, ladislav.huraj@ucm.sk

Abstrakt

Cieľom článku je analýza a skúmanie súčasného bezpečnostného stavu SO-HO (Small Office/Home Office) smerovačov v sieťach s podporou IPv6.

Primárnou motiváciou pre náš článok je trend implementácie IPv6 aj v domácich sieťach. Nárast trendu nasadzovania IPv6 v podnikových sieťach je možné sledovať predovšetkým poslednú dekádu, pričom posledné roky je vidieť, že poskytovatelia domácich pripojení do siete internet ponúkajú prístup aj pomocou IPv6. Práve takýto používatelia sú najviac zraniteľní, keďže neinvestujú dostatočný čas na zabezpečenie svojej domácej siete.

Pri analýze sme pomocou súboru testov dostupnosti služieb zo siete Internet skúmali prednastavené preferencie bezpečnosti a možnosti dodatočnej konfigurácie.

Následne sme pri každom zariadení vytvorili súbor odporúčaní, ktoré zvyšujú bezpečnosť smerovačov v sieťach s IPv6 podporou.

V poslednej časti sme vytvorili porovnanie rýchlostí, ktoré dosahujú smerovače na IPv6 a na IPv4 sieti. Z porovnania vyplýva, že implementácia bezpečnostných pravidiel, nemá vplyv na dosahovanú rýchlosť.

Kľúčové slová: IPv6, Bezpečnosť, SO-HO smerovač, Firewall

Abstract

The aim of our paper is to analyze and investigate the current security state of SOHO (Small Office/Home Office) routers in IPv6 networks.

The primary motivation for our study is the trend of IPv6 adoption in home networks. The adoption of IPv6 in corporate networks has been observed over the last decade. In recent years, we have seen home network providers offering Internet access using IPv6. These users are critical because they don't invest enough time in securing their network.

In our analysis, we examined pre-configured security rules using a series of service availability tests from the Internet. Then, for each device, we developed a guide of recommendations to improve the security of routers in IPv6 networks.

In the final section, we compared the speeds achieved by routers on IPv6 and IPv4 networks to verify that the implementation of security rules had not impact on speeds.

Key Words: IPv6, Security, SO-HO router, Firewall

Úvod

IPv6 siete v poslednej dekáde zaznamenávajú veľkú popularitu. Väčšina poskytovateľov cloudových služieb ako napríklad Amazon Web Services, Azure, ale aj Google Cloud odporúčajú prechod na IPv6, a vyvíjajú tlak na používateľov, aby IPv6 adresy využívali. Niektorí poskytovatelia prichádzajú aj s drastickým krokom spoplatnenia využívania IPv4 adries [2,3]. Siete IPv6 už ale nie sú iba výsadou dátových centier, serverov alebo veľkých podnikových sietí, prípadne len zopár nadšencov, ktorí IPv6 používajú v domácich sieťach.

Posledná doba ukazuje aj trend poskytovania IPv6 pripojenia aj bežným domácnostiam. Podľa najnovších údajov od spoločnosti Akamai, je vidieť, že väčšina krajín po celkom svete postupne implementuje IPv6. Pri niektorých krajinách, ako je napríklad India, alebo aj pri európskych štátoch Nemecko či Francúzsko, percento IPv6 implementácie presahuje hranicu 50 percent [1].

IPv6 sieť prichádza s novými konceptami, ktoré nemusia byť známe používateľom. Hlavnou zmenou okrem zmeny formy adresovania je absencia využívania NAT (Network Adress Translation, preklad sieťových adries) na skrytie privátnych adries. IPv6 prináša koncept, kedy každé zariadenie má svoju verejnú IPv6 adresu, a každé zariadenie je adresovateľné z vonkajšej siete[4].

Práve nesprávne zabezpečená IPv6 sieť, dokáže byť pre používateľov pomerne nebezpečná. Z toho dôvodu je vyvíjaný tlak aj na koncové zariadenia, aby implementovali možnosti nastavenia prístupových pravidiel, ale aj na smerovače určené pre bežných používateľov [5].

1 Analýza smerovačov

Ako sme popísali vyššie, bezpečnosť IP verzie 6 môže byť niekedy zanedbaná aj z dôvodu nedostatočnej znalosti IPv6 problematiky sieťovými správcami. Ohrozenejšou skupinou sú bežní používatelia, ktorí nemajú vôbec znalosť ohľadne bezpečnosti, a spoliehajú sa práve na bezpečnosť, ktorú majú poskytovať dodané smerovače ako základnú bezpečnosť domácnosti. Výrobcovia smerovačov dodnes berú IPv6 len ako doplnkový prvok v ich produktoch, pričom implementujú iba základné funkcionality, ktoré občas nesplňujú ani minimálne požiadavky pre zariadenie ktoré má pracovať s IPv6 [5].

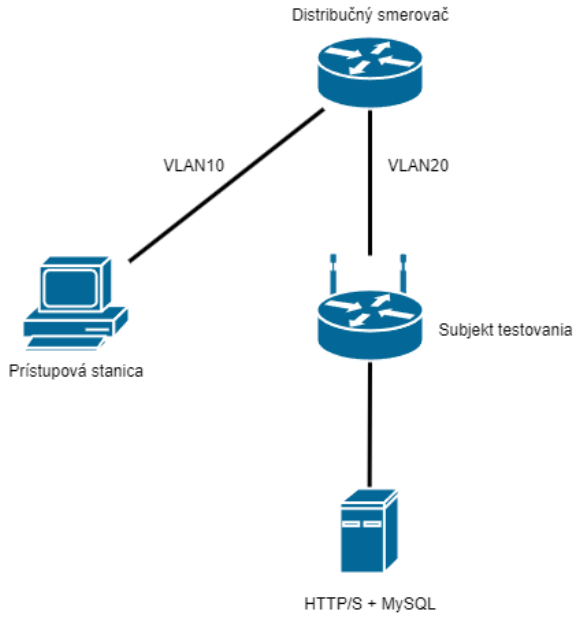
Väčšina smerovačov určených pre SO-HO prostredia v IPv4 sieťach spolieha na využitie NAT, ktorý prekladá privátnu sieť používateľa pod jednu IP adresu, pod ktorou vystupuje do siete poskytovateľa internetových služieb. V tomto momente to môže byť verejná IP adresa, alebo ďalší CG-NAT poskytovateľa služieb. IPv6 tento jednoduchý spôsob zabezpečenia siete nedovoľuje a práve aj na klientskych zariadeniach je potrebná správna konfigurácia firewallu [6].

V našom teste sme si vybrali vzorku smerovačov, ktoré sú často poskytované poskytovateľmi internetových služieb a prezentujú sa ako „IPv6 ready“ zariadenia. Presnejšie sa jednalo o nasledovné zariadenia:

- TP Link Archer C20 v4
- TP Link WRT841N v14
- Mikrotik HaP Lite
- TP-Link WRT741ND so systémom OpenWRT

1.1 Metodika testovania a testovanie

Počas testu sme k smerovaču pripojili naše zariadenie, ktoré simulovalo základnú výbavu webového servera. Toto zariadenie implementovalo HTTP s HTTP serverom a databázu MySQL. Pri každom testovanom smerovači sme testovali jeho prístup z WAN portu pomocou separovanej pracovnej stanice umiestnenej v separátnom subnete. Na základe tohto zapojenia sme dokázali simulovať prístup na smerovač z vonkajšej IPv6 siete Internetu. Schéma zapojenia je zaznačená na obrázku 1.



Obrázok 1 Topologické zapojenie testovacieho prostredia
Zdroj: [Autori]

1.2 TP-Link Archer C20

Zariadenie TP Link Archer C20 je populárny smerovač, ktorý je mnohokrát poskytovaný ako smerovač pre bežné domácnosti, hlavne vďaka jeho WiFi možnostiam. Toto zariadenie taktiež ponúka aj konektivitu pomocou IPv6 pomocou viacerých protokolov ako je DHCPv6, SLAAC ale aj PPPoE. Zariadenie obsahuje jedine SPI firewall, ktorý však nie je možné konfigurovať. Jedinou konfigurovateľnou možnosťou teda ostáva konfigurácia ICMP, pričom výrobca nešpecifikoval či sa jedná o protokol ICMP, alebo protokol ICMPv6.

Počas nášho testovania sme zistili, že výrobca smerovača implementoval firewall jedine pre sieť IPv4, pričom sieť a zariadenie bolo plne dostupné z vonkajšej siete a dokázali sme z vonkajšej siete komunikovať s webovým serverom a taktiež databázou ako je vidieť na obrázku 2.

```
Nmap scan report for 2001:470:5988:2:859e:8e11:15e4:c9df
Host is up (0.0051s latency).
Not shown: 995 filtered ports
PORT     STATE SERVICE
80/tcp   open  http
135/tcp  open  msrpc
443/tcp  open  https
445/tcp  open  microsoft-ds
3306/tcp open  mysql

Nmap done: 1 IP address (1 host up) scanned in 5.05 seconds
```

Obrázok 2 Výstup z *NMAP* skenovania portov a ICMPv6 odpoveď
Zdroj: [Autori]

Počas testovania sme taktiež zistili zaujímavosť, kedy firewall blokoval prichádzajúcu komunikáciu na smerovač, avšak prechádzajúcu komunikáciu už nefiltroval. V tomto režime smerovač filtroval všetku IPv6 komunikáciu, ktorá bola určená smerovaču vrátane ICMPv6. Prostredie smerovača síce poskytovalo možnosť povoliť ICMP komunikáciu, avšak na základe testovania sme zistili, že sa jednalo o ICMP protokol a nie ICMPv6, keďže nenastala žiadna zmena pri zapnutej alebo vypnutej konfigurácií.

Práve takáto konfigurácia sa javí ako kritická a môže byť potencionálne nebezpečná pre neskúsených používateľov, keďže smerovač sa nesnaží ani o základnú filtráciu potencionálne zneužiteľnej komunikácie v sieti.

Aktuálna konfigurácia nedisponuje žiadnymi bezpečnostnými mechanizmami, ktoré by dokázali ochrániť koncové zariadenia pripojené do siete IPv6. Preto naše primárne odporúčanie je implementovať možnosti pre filtráciu IPv6 sieti, pričom v tomto smerovači existovala možnosť implementácie bezpečnostných pravidiel iba v IPv4 sieti. Rovnako odporúčame, aby smerovač v továrenskom nastavení obsahoval minimálne základný preddefinovaný súbor bezpečnostných ACL pravidiel, aby koncový používateľ smerovaču nemusel náročne konfigurovať tieto pravidlá.

1.3 TP-Link WRT841N v14

Smerovač TP-Link WRT841N má dlhu históriu revízií a stal sa populárnym smerovačom hlavne z dôvodu nízkej ceny a primeranej funkcionalite.

V najnovšej revízií v14 pridáva smerovač nový firmware s podporou IPv6. Rovnako ako zariadenie TP-Link Archer C20 podporuje viacero možností pripojenia do siete IPv6. Prvý problém sme objavili pri konfigurácií, kde sme zistili že aktuálny firmware nedokáže správne prijať Prefix Delegation od nadradeného DHCPv6 servera. Zariadenie síce prijalo poskytovaný prefix, avšak ho nevyužil. Problém sme síce vyriešili nastavením statickej konfigurácie, avšak tento problém môže spôsobovať problémy u niektorých poskytovateľov internetových služieb, keďže využívajú technológiu DHCPv6 servera na identifikáciu zákazníkov v sieti.

Pri testovaní bezpečnosti sme narazili na úplne rovnaké problémy ako pri smerovači TP-Link Archer C20, pričom testované zariadenie TP-Link WRT841N obsahovalo novší firmware a očakávali sme nové funkcie v kontexte IPv6 implementácie. Smerovač nefiltroval žiadnu komunikáciu z vonkajšej IPv6 siete a všetky služby boli plne dostupné ako je vidieť nižšie na obrázku 3.

```
bash-3.2$ sudo nmap -6 -Pn 2001::1:f14c:b61c:ed2b:a32e
Starting Nmap 7.94 ( https://nmap.org ) at 2024-02-08 20:24 CET
Nmap scan report for 2001::1:f14c:b61c:ed2b:a32e
Host is up (0.00075s latency).
Not shown: 995 closed tcp ports (reset)
PORT     STATE SERVICE
80/tcp   open  http
135/tcp  open  msrpc
443/tcp  open  https
445/tcp  open  microsoft-ds
3306/tcp open  mysql

Nmap done: 1 IP address (1 host up) scanned in 1.39 seconds
```

Obrázok 3 Výstup z programu *NMAP* pri testovaní smerovaču TP-Link WRT841N
Zdroj: [Autori]

Smerovač WRT841N síce podporuje funkcionalitu ACL (Access Control List), avšak iba v dvoch stavoch. Prvý stav hovorí o štandardných pravidlách v sieti IPv4, kde je možné filtrovať jedine IPv4 komunikáciu. V tomto stave sme skúšali či porty budú blokované aj pre IPv6, avšak pravidlo fungovalo len pre IPv4 sieť. Druhý stav je možnosť prístupového listu pomocou MAC adresy. Takéto nastavenie bolo funkčné aj nad protokolom IPv4 a aj nad IPv6, keďže išlo o blokovanie na úrovni Linkovej vrstvy ISO/OSI. Síce sme dokázali pomocou takýchto pravidiel vytvoriť účinné blokovanie, ale absencia definície portov a potreba špecifickej konfigurácie MAC adresy klienta znemožnila využitie uvedeného spôsobu na funkčnú ochranu zariadení.

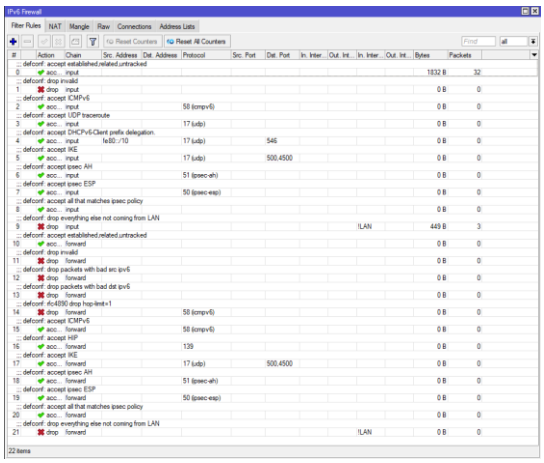
Rovnako ako smerovač TP-Link Archer C20 v4, aj smerovač WRT841N nepodporuje a nedovoľuje používateľovi žiadnu formu bezpečnostnej konfigurácie IPv6 siete. Preto naše odporúčanie je podobné a to vo forme rozšírenia ACL aj pre podporu pravidiel siete IPv6. Továrenské nastavenia by mali od základu chrániť koncové zariadenia a používateľ by mal mať ochranu nie iba od zariadenia, ale aj zo strany smerovača,. Minimálne akceptovateľná by bola konfigurácia blokácie prichádzajúcej komunikácie z vonkajšej IPv6 siete.

1.4 Mikrotik HaP Lite

Mikrotik HaP Lite, patrí k najlacnejšej rade smerovačov od spoločnosti Mikrotik, ktorá je známa svojím operačným systémom RouterOS, ktorý poskytuje pokročilé možnosti konfigurácie. Je však populárny u bežných používateľov, ktorí ho využívajú bez pokročilej konfigurácie iba s nastavením, ktoré je distribuované so zariadením v továrenskom režime.

IPv6 firewall v najnovšej verzií RouterOS 7 je pre štandardného používateľa pomerne robustný.

Výhodou oproti vyššie testovanému smerovaču TP-Link, je transparentnosť a možnosť pokročilej úpravy firewallových pravidiel na mieru pre používateľa. V základe sa smerovač Mikrotik svojou politikou podobá politike „default deny“, kedy posledné pravidlá sú takzvané drop pravidlá. To znamená, že paket pri komunikácii, ktorá sa nezhodovala so žiadnym predchádzajúcim pravidlom, ktoré by povoľovalo takýto typ komunikácie, je na konci vyhodnotený ako nežiadúci a je zahodený. Kompletný zoznam pravidiel je možné vidieť na obrázku 4. Pri testovaní bolo prospešné aj to, že Mikrotik nekombinuje IPv4 a IPv6 firewall. Táto črta značne sprehľadňuje prácu s pravidlami a kategorizáciou na IPv4 a IPv6 sú pravidlá exaktnejšie a nedochádza k mylnému pochopeniu ako sa stalo pri smerovači TP-Link s funkcionalitou povolenia ICMP z WAN rozhrania.



Obrázok 4 Výstup firewallových pravidiel pre IPv6 v aplikácií Winbox
Zdroj: [Autori]

Skúmaním firewallu a testovaním sme spozorovali, že služby na zaradení pripojenom do smerovača Mikrotik boli z vonkajšej IPv6 siete nedostupné, ako je vidieť na obrázku 5. Teda pravidlá efektívne fungovali ako sme očakávali. V takomto prostredí bude musieť používateľ explicitne modifikovať firewallové pravidlá tak, aby povolil špecifickému zariadeniu prístup z vonkajšej IPv6 siete; príkladom môže byť vzdialený prístup do systému bezpečnostných CCTV kamerier.

```
Nmap scan report for 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10
Host is up.
All 1000 scanned ports on 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10 are filtered

Nmap done: 1 IP address (1 host up) scanned in 201.30 seconds
```

Obrázok 5 Výstup z *NMAP* pri použití smerovača Mikrotik HaP Lite
Zdroj: [Autori]

Jediným spoločným faktorom medzi smerovačmi Mikrotik a TP-Link je, že oba umožňujú prechod ICMPv6 požiadaviek v plnom rozsahu, ako je vidno v teste na obrázku 6.

```
PING 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10(2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10) 56 data bytes
64 bytes from 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10: icmp_seq=1 ttl=62 time=2.47 ms
64 bytes from 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10: icmp_seq=2 ttl=62 time=2.47 ms
64 bytes from 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10: icmp_seq=3 ttl=62 time=2.45 ms
64 bytes from 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10: icmp_seq=4 ttl=62 time=2.28 ms
64 bytes from 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10: icmp_seq=5 ttl=62 time=2.40 ms
64 bytes from 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10: icmp_seq=6 ttl=62 time=2.42 ms
64 bytes from 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10: icmp_seq=7 ttl=62 time=2.39 ms
64 bytes from 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10: icmp_seq=8 ttl=62 time=2.48 ms
64 bytes from 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10: icmp_seq=9 ttl=62 time=1.93 ms
64 bytes from 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10: icmp_seq=10 ttl=62 time=2.01 ms
64 bytes from 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10: icmp_seq=11 ttl=62 time=2.61 ms
64 bytes from 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10: icmp_seq=12 ttl=62 time=2.56 ms
^C
--- 2001:470:5988:2:89e:d0ec:ad0d:5e10 ping statistics ---
12 packets transmitted, 12 received, 0% packet loss, time 11012ms
rtt min/avg/max/mdev = 1.933/2.372/2.605/0.196 ms
```

Obrázok 6 ICMPv6 Echo test na zariadenie pripojené cez Mikrotik HaP Lite
Zdroj: [Autori]

Vďaka ICMPv6 je možné zistiť viacero informácií o zariadení, ale hlavne informáciu, že zariadenie je pripojené do siete a odpovedá na echo požiadavku. ICMPv6 v rovnakej forme ako ICMP v IPv4 sieťach je možné využiť na viacero typov útokov, ako je napríklad najznámejší typ Denial of Service útoku menom ICMP Flood, kedy útočník odosiela veľké množstvo požiadaviek. Takýmto spôsobom dokáže efektívne zneprístupniť zariadenie z dôvodu, že sa zariadenie snaží o obsluhu všetkých prijatých požiadaviek. Preto odporúčame blokovať ICMPv6 Echo reply požiadavky, ktoré prichádzajú do smerovača z vonkajšej IPv6 siete [7].

V takomto nastavení lokálne zariadenia aj smerovač budú môcť využívať naplno *ping* verzie 6 avšak zariadenia voči vonkajšej sieti budú filtrované.

1.5 TP-Link WRT741ND so systémom OpenWRT

Ako posledné zariadenie do testovanej vzorky bolo vybraný starší typ zariadenia, a to TP-Link WRT741ND. Aj napriek rýchlemu technologickému pokroku si toto zariadenie stále udržuje veľkú obľubu medzi používateľmi. Firmware smerovača v jeho súčasnej podobe neumožňuje použitie IPv6 konektivity a ani nezahŕňa nástroje na konfiguráciu IPv6 konektivity.

Avšak viacero smerovačov má podporu alternatívneho firmwaru menom OpenWRT. OpenWRT je linuxová distribúcia založená na BusyBox, ktorá rozširuje možnosti smerovača a pridáva nové funkcionality, ktoré väčšina pôvodných systémov neumožňuje. Príkladom môže byť napríklad pokročilejšia IP konfigurácia, tvorba VLAN sietí, pokročilejšie možnosti pre konfiguráciu bezdrôtových

sietí, ale aj napríklad podpora IPv6, ktorá je práve pre nás zaujímavá a žiadaná [8].

Smerovač TP-Link WRT741ND alternatívnym firmwarom OpenWRT podporoval a správne prijímal základné nastavenie siete pomocou DHCPv6 PD. Zaujímavým faktom bola zapnutá podpora IPv6 aj v základnom nastavení, ktoré OpenWRT ponúka. Táto možnosť sa neobjavila v žiadnom z predchádzajúcich testovacích zariadeniach. Pri smerovačovi od spoločnosti Mikrotik, bolo potrebné dokonca doinštalovať balík pre podporu IPv6.

Firmware OpenWRT rozdeľuje svoj firewall do dvoch štandardných zón: WAN a LAN. Továrenské nastavenie definuje politiku pre WAN zónu default deny smerom do LAN siete. Veľkým prínosom je možnosť podrobnej konfigurácie firewallových pravidiel, podobne ako to bolo pri smerovači Mikrotik. Následným testovaním sa nám potvrdilo, že naozaj smerovač používal politiku „default deny“ s tým, že dovoľoval prijímanie a posielanie ICMPv6 správ z vonkajšej siete do svojej lokálnej siete, ako je vidieť na obrázku 7.

```
Starting Nmap 7.93 ( https://nmap.org ) at 2024-02-06 05:08 UTC
Nmap scan report for 2004::1:e7a:dfff:fe63:1
Host is up (0.0022s latency).
All 1000 scanned ports on 2004::1:e7a:dfff:fe63:1 are in ignored states.
Not shown: 1000 closed tcp ports (reset)

Service detection performed. Please report any incorrect results at https://nmap.org/submit/ .
Nmap done: 1 IP address (1 host up) scanned in 13.60 seconds
```

Obrázok 7 Výstup z *NMAP* skenovania a ICMPv6 Testu pre zariadenie TP-Link WRT741ND s OpenWRT
Zdroj: [Autori]

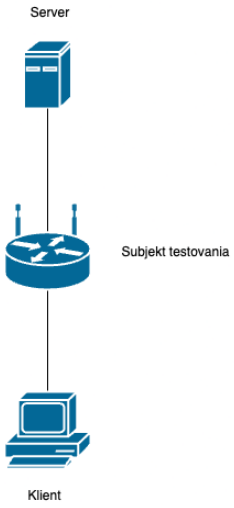
V tomto nastavení je celá prichádzajúca komunikácia blokovaná s výnimkou ICMPv6. Uvedené nastavenie je veľmi podobné nastaveniu smerovaču Mikrotik.

Na základe vykonaného testovania je naše odporúčanie rovnaké ako pri zariadení Mikrotik, čiže blokovanie ICMPv6 z vonkajšej IPv6 siete.

2. Test rýchlostí sietí IPv4 a IPv6

Počas testovania bezpečnosti, sme si vykonali na každom smerovači test rýchlosti sťahovania (download) a test rýchlosti odosielania (upload) v oboch sieťach IPv4 a IPv6. Je známe že IPv6 v bežnej sieti nevyužíva technológie ako je napríklad NAT, ktoré pridávajú nároky na hardvér smerovača a v niektorých prípadoch dokážu odosielať požiadavky rýchlejšie než štandardná domáca IPv4 sieť.

Testovanie bolo vykonávané pomocou utility *iperf3*, pričom klient bol pripojený pomocou zvoleného smerovača. Server bol v topológií pripojený nad smerovač tak, aby sme dosiahli, že komunikácia na server bude musieť prechádzať cez WAN port. Celá topológia je vidieť na obrázku 8.

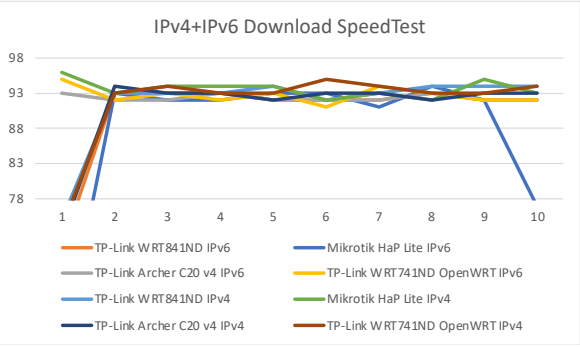


Obrázok 8 Topológia zapojenia zariadení pri výkone testu
Zdroj: [Autori]

Pri testovaní sme vykonávali jedine jednosmerné testovanie, teda v jednom bode sme testovali buď sťahovanie (download) alebo nahrávanie (upload). Pri teste boli použité prednastavené hodnoty *iperf3*, pričom odosielaná veľkosť požiadavky bola 128 kilobajtov s tým, že bolo odoslaných 10 požiadaviek v segmente 10 sekúnd.

2.1 Výsledky Download testovania

V teste sťahovania sme skúmali každé zariadenia z vybranej vzorky tak pomocou siete IPv4 ako aj pomocou IPv6. Z dôvodu že, všetky testované smerovače boli limitované maximálnou rýchlosťou sieťových rozhraní a to 100Mbit/s, nebolo potrebné vykonávať úpravu, prípadne prevod nameraných hodnôt a boli spracovávané čisté rýchlosti, ktoré poskytol program *iperf3*.



Graf 1 Výsledky IPv4 a IPv6 testu sťahovania
Zdroj: [Autori]

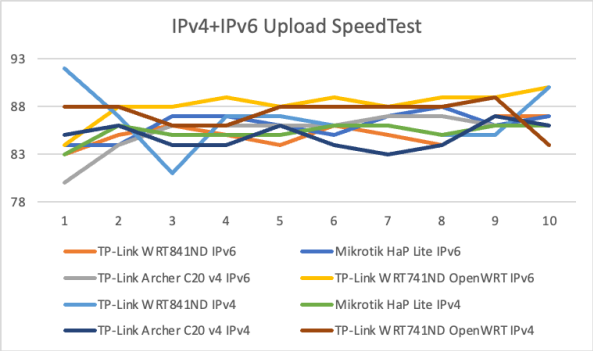
Ako je vidieť na grafe 1, pri teste všetkých zariadení pomocou IPv6, ale aj IPv4, sa hodnoty rýchlostí pohybovali v rozmedzí medzi 90 až 95 Mbit/s. Pri testovaní sme spozorovali, že niektoré zariadenia mali problém pri prvom sťahovaní požiadavky, pričom v ďalších meraniach rýchlosť bola vyššia. To môže byť zapríčinené rýchlosťou inicializácie TCP komunikácie, ktorá sa nazýva TCP Slow Start [9].

Pri zariadení Mikrotik HaP Lite IPv6 sme spozorovali aj skutočnosť, že posledná požiadavky mala nižšiu rýchlosť, to môže byť z dôvodu rýchlosti ukončovacej fázy TCP [10].

Vo výsledku však namerané hodnoty medzi IPv6 sieťou a IPv4 sieťou boli veľmi podobné s minimálnymi rozdielmi.

2.2 Výsledky Upload testovania

Pri testovaní rýchlosti nahrávania sme použili totožnú metodiku ako pri testovaní sťahovania.



Graf 2 Výsledky IPv4 a IPv6 testu nahrávania
Zdroj: [Autori]

Ako je vidieť na grafe 2, namerané hodnoty boli odlišnejšie od rýchlostí, ktoré boli namerané pri teste sťahovania. Počas testu nahrávania boli hodnoty v rozmedzí 80 až 90 Mbit/s. Pri niektorých smerovačoch, ako je napríklad Mikrotik HaP Lite, na IPv6 sieti boli tieto hodnoty pomerne kolísavé. Prekvapením bolo, že najslabší smerovač zo vzorky testovaných smerovačov TP-Link WRT741ND s OpenWRT na IPv6 sieti dosahoval najvyššie stabilné výsledky pri meraní. Ale vo všeobecnosti hodnoty merania medzi IPv6 a IPv4 boli podobné s minimálnymi rozdielmi, ktoré môžu byť zapríčinené aj nastavením TCP.

Záver

Z nášho testovania sme zistili, že pripravenosť vzorky smerovačov určených pre domácnosti je rôzna a v niektorých prípadoch môže byť pre používateľa nebezpečná. Smerovače od spoločnosti TP-Link skončili v testovaní najhoršie. Keďže tieto zariadenia, preferovali funkcionality len v prospech IPv4 sieti, tak ostala IPv6 sieť nezabezpečená. Firmware smerovača nepodporoval ani možnosť dodatočného zabezpečenia siete.

Zaujímavosťou bolo, že konektivita pomocou IPv6 bola na smerovačoch od TP-Link pomerne nekvalitne spracovaná. Pomocou DHCPv6 servera sa nám nepodarilo získať prefix, jediná možnosť, ktorá bola pre nás funkčná bolo nastavenie statickej adresy a nasmerovanie prefixu pomocou statického smerovania.

Smerovač od spoločnosti Mikrotik obsahoval IPv6 firewall, ktorý obsahoval pravidlá podľa politiky „default deny“, pričom povoľoval prijímanie a posielanie ICMPv6 správ do vnútornej siete. Výhodou smerovaču od spoločnosti Mikrotik je určite možnosť komplexného nastavenia bezpečnostných pravidiel, pričom používateľ si dokáže navrhnúť bezpečnostnú politiku siete podľa potrebných požiadaviek.

Ako zaujímavosť sme k testovacím zariadeniam pridali aj zariadenie TP-Link WRT741ND, ktoré nepodporovalo IPv6, avšak v komunitnom operačnom systéme OpenWRT bola táto možnosť prístupná. Firmware OpenWRT obsahoval IPv6 firewall, ktorý mal rovnako ako smerovač od spoločnosti Mikrotik preddefinovanú politiku default deny s povoleným ICMPv6. Taktiež OpenWRT podporoval tvorbu dodatočných bezpečnostných pravidiel. Toto zariadenie sme pridali do testovania z dôvodu poukázania, že implementácia bezpečnostných pravidiel je možná aj na nízko výkonné smerovače. Okrem iného bolo snahou ukázať, že základný firmware smerovačov stále uprednostňuje nastavenia IPv4 sietí, pričom IPv6 považuje iba len ako dodatok.

OpenWRT je podporované viacerými smerovačmi, aj smerovačmi TP-Link Archer C20 a WRT841N, ktoré boli použité v testovaní, pričom rozhranie LuCI, ktoré využíva OpenWRT, je totožné pre všetky zariadenia.

V poslednej časti sme vykonali test rýchlosti na každom zariadení. Testovali sme tak jednak IPv4 sieť, ale aj IPv6 sieť. Keďže IPv6 sieť nepotrebuje využívať mechanizmy ako je napríklad práve NAT na preklad privátnych adries na vonkajšiu IP adresu, očakávali sme rozličné hodnoty. IPv6 siete, keďže vyžadujú menšiu réžiu a taktiež ich IPv6 paket disponuje fixnou dĺžkou

hlavičky 40 bajtov, môžu byť v niektorých prípadoch rýchlejšie na rovnakom smerovači ako siete IPv4.

Z vykonaných testov však vyplynulo, že hodnoty sú pre obidva typy sietí porovnateľné a medzi sebou sa vo väčšej miere nelíšili. Je možné konštatovať, že pri testovaných zariadeniach sme nenamerali signifikantný rozdiel v hodnotách sťahovania alebo nahrávania medzi protokolmi IPv4 a IPv6.

Práca sa dá ďalej rozvíjať hlavne výberom novej a väčšej vzorky smerovačov od rôznych výrobcov. Možné rozšírenie práce by mohlo byť aj definovanie a realizovanie súboru reálnych útokov, ako je napríklad Rogue Router Advertisement alebo ICMPv6 Flood na koncové zariadenia pripojené cez smerovače a sledovať chovanie smerovačov ako sa dokážu vysporiadať a následne zotaviť z útokov.

Použitá literatúra

[1] AKAMAI. IPv6 Adoption Visualization. Akamai [online]. 2024 [cit. 2024-02-25]. Dostupné z: https://www.akamai.com/internet-station/cyber-attacks/state-of-the-internet-report/ipv6-adoption-visualization

[2] PREHN, Lars; LICHTBLAU, Franziska; FELDMANN, Anja. When wells run dry: the 2020 IPv4 address market. In: Proceedings of the 16th International Conference on emerging Networking EXperiments and Technologies. 2020. p. 46-54.

[3] AMAZON WEB SERVICES. New – AWS Public IPv4 Address Charge + Public IP Insights. Online. Amazon Web Services. 2023. Dostupné z: https://aws.amazon.com/blogs/aws/new-aws-public-ipv4-address-charge-public-ip-insights/. [cit. 2024-02-25].

[4] SAMAD, Fahad, et al. The future of internet: IPv6 fulfilling the routing needs in internet of things. International Journal of Future Generation Communication and Networking, 2018, 11.1: 13-22.

[5] SAIDI, Said Jawad; GASSER, Oliver; SMARAGDAKIS, Georgios. One bad apple can spoil your IPv6 privacy. ACM SIGCOMM Computer Communication Review, 2022, 52.2: 10-19.

[6] FORTINET. What Is Network Address Translation (NAT)? [online]. [cit. 2024-02-25]. Dostupné z: https://www.fortinet.com/lat/resources/cyberglossary/network-address-translation

[7] SAAD, R. M.; RAMADASS, Sureswaran; MANICKAM, Selvakumar. A study on detecting ICMPv6 flooding attack based on IDS. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2013, 7.2: 175-181.

[8] PALAZZI, Claudio E.; BRUNATI, Matteo; ROCCETTI, Marco. An OpenWRT solution for future wireless homes. In: 2010 IEEE International Conference on Multimedia and Expo. IEEE, 2010. p. 1701-1706.

[9] ALLMAN, Mark; PAXSON, Vern; BLANTON, Ethan. TCP congestion control. 2009.

[10] POSTEL, Jon. Transmission control protocol. 1981.

Interakcia s počítačom sledovaním pohybu oka pomocou webkamery

Interaction with computer by tracking eye movements using a camera

Mário Chrušč[1] – Michal Vagač[1]
Školiteľ: Michal Vagač[1]
[1]Katedra informatiky, FPV UMB, Tajovského 40, 974 09 Banská Bystrica
mario.chrusc@student.umb.sk, michal.vagac@umb.sk

Abstrakt

Článok sa zameriava na význam techník spracovania obrazu, konkrétne detekcie tvárí a kontúrovania, v kontexte identifikácie očí na tvári. Počítačové videnie a analýza obrazu sa stávajú neoddeliteľnou súčasťou viacerých aplikácií, vrátane biometrických systémov, bezpečnostných opatrení a rozpoznávania emócií. V článku sa najprv predstavujú základné princípy detekcie tvárí a kontúrovania, po ktorých nasleduje ich implementácia v praxi pomocou knižníc OpenCV a dlib v jazyku Python. Ciele článku zahŕňajú demonštráciu dôležitosti týchto techník, prepojenie medzi nimi a príklady ich využitia v reálnom svete. Výsledkom je pochopenie základných konceptov a potenciálu týchto techník, ktoré môžu prispieť k ďalšiemu rozvoju v oblasti počítačového videnia a analýzy obrazu.
Kľúčové slová: sledovanie očí, OpenCV, dlib, Python, počítačové videnie

Abstract

Article focuses on the importance of image processing techniques, namely face detection and contouring, in the context of facial eye identification. Computer vision and image analysis are becoming an integral part of many applications, including biometric systems, security measures, and emotion recognition. The article first presents the basic principles of face detection and contouring, followed by their practical implementation using the OpenCV and dlib libraries in Python. The goals of the article include demonstrating the importance of these techniques, the connections between them, and examples of their use in the real world. The result is an understanding of the basic concepts and the potential of these techniques, which can contribute to further development in the field of computer vision and image analysis.
Keywords: eye tracking, OpenCV, dlib, Python, computer vision

Úvod

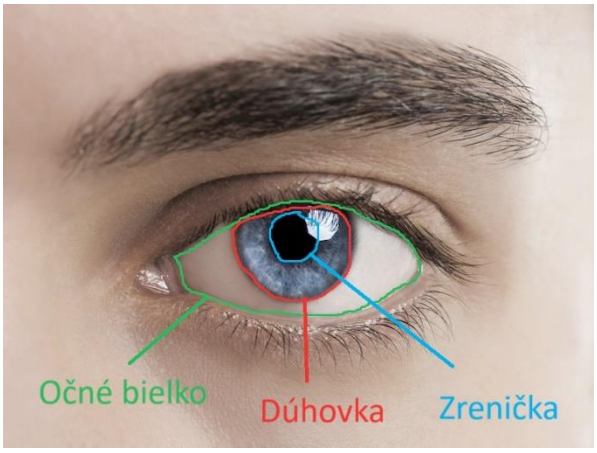
Interakcia s počítačom prostredníctvom sledovania pohybu oka je jednou z inovatívnych metód, ktoré umožňujú užívateľom intuitívnejšie ovládať technológie. Táto práca sa zaoberá vývojom systému využívajúceho Python a knižnice Dlib na sledovanie obrysov tváre a rôznych čŕt ako napríklad oči, obočie ústa a knižnicu OpenCV na monitorovanie pohybu zrenice pomocou kamery. Cieľom je vytvoriť prostriedok, ktorý zjednoduší interakciu s počítačom pre ľudí s rôznymi formami fyzickej neschopnosti.

Pomocou tejto technológie môžu užívatelia riadiť počítač pohybom svojich očí, čím sa eliminuje potreba používania klávesnice alebo myši. Tento systém ponúka možnosť zvýšenej mobility a nezávislosti pre tých, ktorí majú obmedzené pohybové schopnosti. Okrem toho, prostredníctvom sledovania pohybu očí je možné implementovať rôzne funkcie, ako je napríklad vyberanie ikon, písanie textu alebo navigácia po webových stránkach.

Využitie a sprostredkovanie tejto technológie je neoceniteľné, pretože umožňuje ľudom s telesným postihnutím jednoduchší prístup k počítačovým zdrojom a komunikácii s okolím. Projekt sa sústreďuje na vytvorenie bezbariérovej interakcie s technológiou, čo môže viesť k zvýšeniu kvality života tých, ktorí sú závislí na asistenčných pomôckach.

1 Štruktúra oka

Skôr než prejdeme k detailom spracovania obrazu je viacej možností ako to uskutočniť s ohľadom na štruktúru oka (Obr.1). Na obrázku 1. je zobrazené oko, ktoré pozostáva z troch hlavných častí ako zrenička, ktorá je vždy čierna, dúhovka s rôznou farbou pre rôznych ľudí a očné bielko, ktoré je vždy biele.



Obr. 1 Štruktúra oka
Zdroj: [1]

2 Využitie knižníc OpenCV a dlib na detekciu oka

Dlib je knižnica v jazyku C++, ktorá sa venuje rôznym oblastiam počítačového videnia, najmä detekcii tváre a vytváraniu tvaru tváre. Ponúka nástroje na rýchle a efektívne detekcie tvárí a extrakciu dôležitých bodov, ako sú oči, nos a ústa. Tieto body sú potom použité na rôzne aplikácie, ako je sledovanie pohybu tváre, rozpoznávanie emócií a ďalšie. Dlib využíva pokročilé algoritmy strojového učenia, napríklad kaskádové klasifikátory alebo analýzu hlavných komponentov, na presné lokalizovanie rôznych častí tváre.

Pri detekcii tváre Dlib využíva kaskádové klasifikátory na identifikáciu regiónov tváre v obraze.[3] Následne používa analýzu hlavných komponentov na presné lokalizovanie bodov tváre, ako sú oči, nos a ústa. Tieto body sú definované pomocou preddefinovaných indexov, ktoré sú uložené v štruktúre FACIAL_LANDMARKS_IDXS. Po získaní súradníc týchto bodov je možné ďalej spracovávať tvár a jej časti.

Knižnica OpenCV je ďalšou dôležitou súčasťou tohto kódu. OpenCV je knižnica pre počítačové videnie v jazyku C++ a Python, ktorá ponúka rôzne nástroje na manipuláciu s obrázkami a videami. V tomto kóde sa využíva na spracovanie obrazu, konkrétne na prácu s prahovaním a kontúrami.[4]

Prikazy threshold a contours sa využívajú na spracovanie obrazu očí pre zistenie pohybu zrenice. Funkcia cv2.adaptiveThreshold používa adaptívne prahovanie na vytvorenie binárneho obrazu z obrazu očí, ktorý sa používa na jednoduchšie rozlíšenie kontúr. Metóda cv2.findContours potom identifikuje kontúry v binárnom obraze. Tieto kontúry sú následne filtrované, aby sa našla kontúra zrenice. Pomocou momentov obrazu sa zisťuje stred zrenice, ktorý sa označí červeným bodom na obraze a podľa polohy vzhľadom na stred obrazovky sa určuje smer pohybu zrenice.

Tieto postupy umožňujú sledovanie pohybu očí pomocou kamery a poskytujú dôležité informácie pre ďalšiu interakciu s počítačom, čo je kľúčovým cieľom tejto práce.[5]

2.1 Threshold

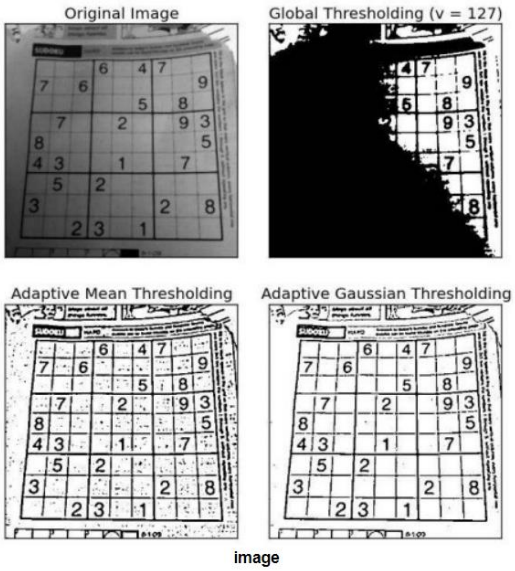
Thresholding (prahovanie) je proces binarizácie obrázka, kde sa hodnoty pixelov obrázka transformujú na binárne hodnoty (napr. 0 a 255) podľa určitého prahu. Tento prah určuje, ktoré pixely budú považované za čierny alebo biely podľa toho, či ich hodnota je nižšia alebo vyššia ako stanovený prah.

Existujú rôzne spôsoby, ako aplikovať prahovanie na obrázok. Jedným z najjednoduchších je tzv. globálne prahovanie, kde je prah konštantná hodnota, ktorá sa používa pre všetky pixely obrázka. Pri použití globálneho prahovania sa porovnávajú hodnoty pixelov s touto konštantnou hodnotou prahu a pixely s hodnotou nižšou ako prah sa nastavia na jednu hodnotu (často 0 alebo čierna), zatiaľ čo pixely s hodnotou vyššou ako prah sa nastavia na inú hodnotu (často 255 alebo biela).

Adaptívne prahovanie je variant prahovania, ktorý umožňuje adaptovať prah pre každú oblasť obrázka na základe jej okolia. To znamená, že prah sa môže meniť v rôznych častiach obrázka v závislosti od okolitých hodnôt pixelov. Táto metóda sa často používa na spracovanie obrázkov s nejednotným osvetlením alebo kontrastom.

Rozdiel medzi adaptívnym prahovaním a globálnym prahovaním spočíva v tom, že adaptívne prahovanie dynamicky určuje prah pre každú časť obrázka na základe okolitých hodnôt pixelov, zatiaľ čo pri globálnom prahovaní je prah konštantný pre celý obrázok. To umožňuje adaptívnejšiu a flexibilnejšiu binarizáciu obrázkov, čo môže byť užitočné pri spracovaní obrázkov s rôznym osvetlením, kontrastom

alebo šumom.[5]



Obr. 2 Threshold
Zdroj: [1]

2.2 Kontúrovanie

Po prevedení obrazu do odtieňov sivej sa používa funkcia kontúrovania, ktorá sa používa na identifikáciu a následné vykreslenie obrysov, objektov alebo regiónov v obraze. Tieto obrysy sú definované ako súvislá množina bodov, ktoré tvoria hranicu medzi rôznymi regiónmi v obraze s rôznymi vlastnosťami pixelov.

Proces kontúrovania sa zvyčajne skladá z niekoľkých krokov:

1. Binárizácia obrázka: Pred samotným kontúrovaním sa často aplikuje technika binarizácie, ako je prahovanie, na rozdelenie obrázka na oblasti, ktoré sú buď čierne alebo biele podľa určitého prahu. To umožňuje jednoduchšiu identifikáciu hrán.
2. Nájdenie hrán: Po binarizácii sa hľadajú hranice medzi oblasťami s rôznymi hodnotami pixelov. To sa dá dosiahnuť pomocou algoritmov na detekciu hrán, ako je napríklad Cannyho detektor hrán.
3. Kontúrovanie: Po nájdení hrán sa aplikuje algoritmus kontúrovania, ktorý identifikuje súvislé množiny bodov na týchto hraniciach. Existuje niekoľko algoritmov kontúrovania, ale jeden z najčastejšie používaných je algoritmus "Ramerc-Kasser" (Ramer-Douglas-Peucker), ktorý redukuje počet bodov v kontúre, zachovávajúc jej tvar.
4. Vykreslenie kontúr: Nakoniec sa vykreslia identifikované kontúry na obrázok. Toto sa zvyčajne robí tak, že sa pomocou grafických knižníc ako OpenCV vykreslí obrys alebo vyplní vnútro kontúry farbou.

Kontúrovanie je dôležitá technika v oblasti spracovania obrazu, ktorá má široké využitie. Používa sa na identifikáciu a vykreslenie hrán objektov alebo regiónov v obraze. Táto technika sa uplatňuje v rôznych aplikáciách vrátane:

- Rozpoznávanie objektov
- Segmentácia obrazu
- Meranie tvarov objektov
- Ďalšie úlohy v počítačovom videní a analýze obrazu

V kontexte nášho kódu, je kontúrovanie použité na identifikáciu hrán zreničky na detegovanom oku v obraze. Tento proces umožňuje presnejšie lokalizovať oblasti dúhovky a následne vykonať ďalšiu analýzu, napríklad detekciu zreníc alebo sledovanie pohybu očí.

Ako posledný krok sa po vykontúrovaní obrazu a nájdení dúhoviek zistí stred dúhovky, kde sa vykreslí červený bod.[6]

3 Riešenie problému

Riešenie problému sledovania oka v kóde má viacero častí. Po načítaní obrazu do aplikácie sa v ňom pomocou knižnice dlib hľadajú obrysy tváre. Na výstupe je obraz s identifikovanými časťami tváre (Obr. 3).



Obr.3 Obrysy tváre
Zdroj: [autor]

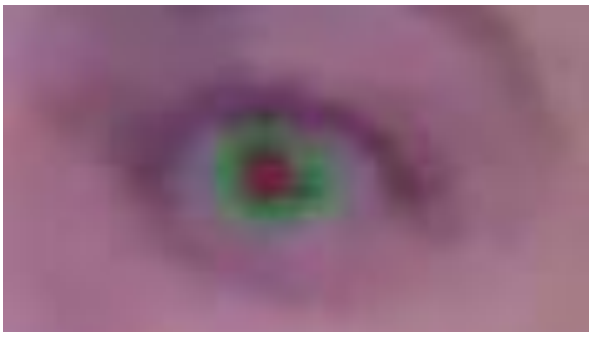
Ďalším krokom pre dosiahnutie cieľu je získanie iba výrezu očí, pretože iné obrysy nie sú potrebné (Obr. 4).



Obr.4 Výrez očí
Zdroj: [autor]

Ďalej sa obrysy spracúvajú vo funkcii, ktorá z nadobutnutého obrazu spraví obraz v odtieňoch sivej (aplikovaním adaptívneho prahovania).

Na záver sa vyhľadáva dúhovka pomocou analýzy očí kontúrovaním a jej stred, na ktorý sa vykreslí červený bod. Podľa jeho pozície sa vie kam sa oko pozerá a ako sa posúva.



Obr.5 Nájdenie stredu oka

Záver

Tento článok prezentoval dôležité techniky spracovania obrazu, konkrétne detekciu tváre a kontúrovania, ako nástroje na identifikáciu a lokalizáciu dôležitých častí tváre, ako sú oči. Použitie týchto techník umožňuje presnejšie analyzovať obraz a extrahovať užitočné informácie o tvárach, ktoré sa dajú naďalej využiť v rôznych sférach ako napríklad pomoc ľuďom s rôznou fyzickou neschopnosťou.

Použitá literatúra

[1] Image Thresholding.[online].opencv.org.Dostupné na internete: https://docs.opencv.org/4.x/d7/d4d/tutorial_py_thresholding.html

[2] How the Human Eye Works.[online].livescience.com.[2016-05-05].Dostupné na internete: https://www.livescience.com/3919-human-eye-works.html

[3] Facial landmarks detection with dlib and haar cascade.[online].medium.com.[2020-11-30].Dostupné na internete: https://medium.com/analytics-vidhya/facial-landmarks-detection-with-dlib-and-haar-cascade-e3c8195131d7

[4] OpenCV.modules.[online].docs.opencv.org.Dostupné na internete: https://docs.opencv.org/4.x/index.html

[5] OpenCV.modules.[online].docs.opencv.org.Dostupné na internete: https://docs.opencv.org/4.x/d7/d4d/tutorial_py_thresholding.html

[6] OpenCV.modules.[online].docs.opencv.org.Dostupné na internete: https://docs.opencv.org/3.4/d4/d73/tutorial_py_contours_begin.html

Výpočet orientácie známeho predmetu z 3D obrazu

Calculation of object orientation from 3D image

Erik Kulka[1] – Michal Vagač[1]
Školiteľ: Michal Vagač[1]
[1]Katedra informatiky, FPV UMB, Tajovského 40, 97401 Banská Bystrica,
ekulka@student.umb.sk, michal.vagac@umb.sk

Abstrakt
Článok sa zaoberá prácou s 3D kamerou a implementáciou algoritmu detekcie hrán na výpočet orientácie známeho objektu z 3D obrazu. Táto implementácia má za úlohu zlepšiť a automatizovať systém piece-picking v priemyselnom prostredí za pomoci robotického ramena a 3D kamery, čím by sa zvýšila efektivita, presnosť a minimalizovalo by sa riziko chýb.

V prvej časti sa zameriavame na spracovanie obrazu, hĺbkovej mapy obrazu a vytváranie point cloudov. Následne prechádzame na spracovanie samotného point cloudu a implementáciu algoritmu na detekciu hrán známeho objektu, čo je kľúčovým krokom pre úspešnú identifikáciu a manipuláciu s produktmi. Práca ďalej zahŕňa implementáciu Robot Operating System (ROS) na zabezpečenie komunikácie medzi komponentami systému a využitie kamery XBOX 3D Kinect V2 na zachytávanie obrazu a hĺbky obrazu. Tento integrovaný prístup prináša efektívne riešenie pre modernizáciu priemyselných procesov založených na výbere produktov.

Kľúčové slová: hĺbková mapa, point cloud, KNN, pomer sigma, ROS

Abstract
The article deals with work with a 3D camera and the implementation of an edge detection algorithm for calculating the orientation of a known object from a 3D image. This implementation aims to improve and automate the piece-picking system in an industrial environment with the help of a robotic arm and a 3D camera, which would increase efficiency, accuracy and minimize the risk of errors.

In the first part, we focus on image processing, image depth map and creating point clouds. Subsequently, we move on to the processing of the point cloud itself and the implementation of the algorithm for detecting the edges of a known object, which is a key step for successful identification and handling of products. The work further includes the implementation of the Robot Operating System (ROS) to ensure communication between the system components, and the use of the XBOX 3D Kinect V2 camera for image capture and image depth. This integrated approach provides an effective solution for the modernization of industrial processes based on product selection.

Key words: depth map, point cloud, KNN, sigma ratio, ROS

Úvod

V posledných rokoch robotika po automatizácií v priemysle viedla k vývoju rôznych výberových systémov. Systémy ako piece-picking, pallet-picking alebo case-picking sa využívajú v celosvetovom rebríčku ako uľahčenie a časové zefektívnenie práce.

Piece-picking je systém automatizovaného výberu individuálneho produktu z množiny produktov robotickým ramenom na základe označenia jednotlivej položky v tvare SKU (Stock Keeping Unit) zo skladového zásobníka. Následne robot ďalej manipuluje s daným produktom buď jeho umiestnením do konkrétneho kontajnera alebo nádoby. Tento proces sa často využíva v priemysloch, kde sa pracuje s nadmerným množstvom rôznych samostatných položiek.[1]

Samostatná funkčnosť robotického ramena sa odvíja od 3D kamery, ktorá zachytí obraz položiek v skladovom zásobníku a podľa snímky dokáže robotické rameno na základe výpočtových algoritmov v riadiacom systéme vybrať produkty na základe podmienok ako napríklad hmotnosti, polohy, tvaru ale aj následnej polohy produktu v skladovom zásobníku. Pomocou mechanickej ruky robot vyberie individuálny typ produktu, následne pomocou SKU identifikuje produkt a premiestni ho do skladového zásobníka. Čím viac robotické rameno opakuje svoje procesy, tým zrýchľuje svoju efektivitu, zvyšuje presnosť výpočtov a hlavne znižuje riziko výskytu chýb.[2]

Splnenie podmienok vybratia produktu má na starosti 3D kamera pripevnená na robotickom ramene, v našom prípade kamera XBOX 3D Kinect V2, s ktorou budeme pracovať.

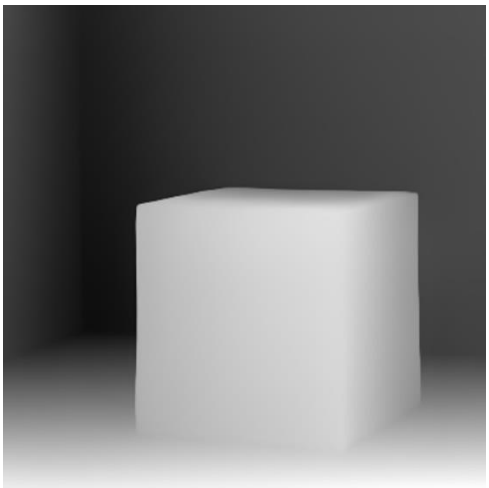
1 Spracovanie obrazu

Keďže naším cieľom je vypočítať orientáciu známeho predmetu, tak sme sa na začiatok zamerali na prácu a úpravu samotného 3D obrazu. Ako testovacie dáta pre náš algoritmus sme použili adekvátny obrázok vybraného objektu a jeho hĺbkovú mapu obrazu, ktorú sme dostali za pomoci umelej inteligencie.

Hĺbková mapa obsahuje informácie o vzdialenosti bodov objektu v určitej perspektíve. Každému pixelu je priradená hodnota, ktorá predstavuje vzdialenosť pixelu od referenčného bodu, čo vytvára 3D reprezentáciu scény. [3]



Obr. 1 Testovací objekt
Zdroj: [1]



Obr. 2 Hĺbkové zobrazenie testovacieho objektu
Zdroj: [Autor]

Aby sme mohli pracovať s naším obrazom, potrebujeme vytvoriť point cloud z uvedených dát, ktorý následne dokážeme upravovať podľa našich potrieb.

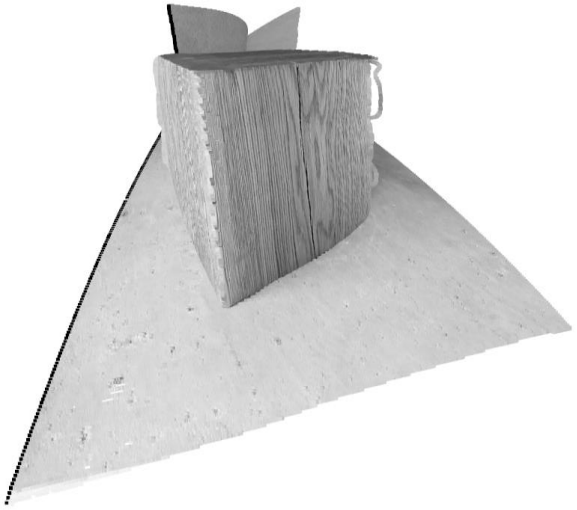
Kameru, ktorú máme k dispozícií dokáže zasielať informácie o farebnom a hĺbkovom obraze objektu ako dáta s ktorými vieme ďalej pracovať.

1.1 Point cloud

Point cloud je množina údajových bodov v 3D priestore, kde body spolu predstavujú 3D tvar alebo objekt. Každý bod v súbore údajov je reprezentovaný geometrickými súradnicami x, y a z. [4]

V našom prípade sme museli prepojiť RGB obraz a hĺbkovú mapu obrazu, aby sme mohli vytvoriť RGBD obraz. Ďalej sme preniesli tento obraz do matice kamery, ktorá ukladá výšku a šírku obrazu a neskôr sme vytvorili samotný point cloud z daného RGBD obrazu a hodnôt kamery. Keďže pracujeme s obrázkovými dátami, tak point cloud nie je ideálny.

Pre spracovanie point cloudu sme používali Python knižnice open3D a PyntCloud, ktoré pracujú s 3D dátami.

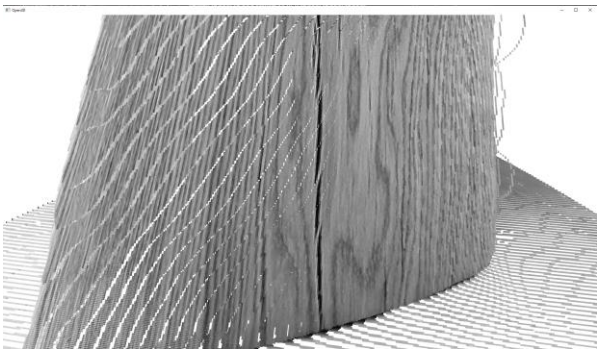


Obr. 3 Point cloud
Zdroj: [Autor]

1.2 Spracovanie point cloudu

Pred samotným algoritmom na detekciu hrán sme museli spracovať point cloud z dôvodu veľkého počtu bodov a zjednodušenia manipulácie.

Začali sme metódou voxel downsampling, ktorá používa voxelovú mriežku na vytvorenie rovnomerne downsamplovaného point cloudu. [5]



Obr. 4 Voxel downsampling
Zdroj: [Autor]

Ako môžeme vidieť (Obr. 4) voxel downsampling pretriedil skoro 50% bodov point cloudu.

1.2 Detekcia hrán

Algoritmus na detekciu hrán spočíva na princípe algoritmu k-nearest neighbors (KNN) a určení hrán na základe prahu.

KNN algoritmus je jeden zo základných klasifikačných algoritmov. Využíva blízkosť bodov na vytváranie klasifikácií alebo predpovedí o zoskupení jednotlivých bodov. Aby bolo možné určiť, ktoré dátové body sú najbližšie k danému bodu dopytu, je potrebné vypočítať vzdialenosť medzi bodom dopytu a ostatnými dátovými bodmi. Tieto metriky vzdialenosti pomáhajú vytvárať hranice rozhodovania, ktoré rozdeľuje body dotazu do rôznych oblastí. [6]

Ďalej si potrebujeme uložiť súradnice x, y a z všetkých bodov point cloudu. Uložíme si ich do samostatných polí, aby sme s nimi mohli jednoducho manipulovať. Tento krok nám uľahčuje rôzne operácie, ako je vizualizácia, filtrovanie alebo transformácia point cloudu. Taktiež si uložíme tri vlastné čísla bodov, ktoré označujú informácie o smere alebo zakrivení point cloudu.

Vypočítame si súčet vlastných čísel pre každý bod a následne pomer sigma na základe najväčšej vlastnej hodnoty. Pomer sigma je nameraný rozptyl vydelený predpokladaným rozptylom. [7] Tento výpočet je potrebný spraviť z dôvodu normalizovanej skalárnej hodnoty všetkých troch vlastných čísel. Na základe vypočítaných hodnôt sigma vieme zistiť, že body s hodnotami sigma nad prahovou hodnotou sa považujú za hrany.

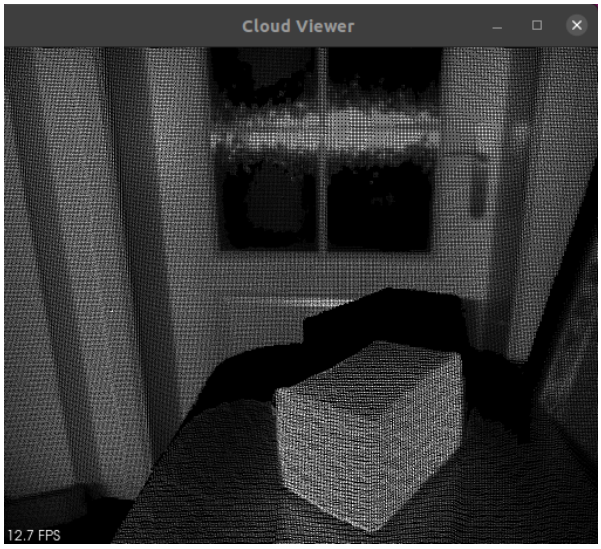
2 Získavanie dát z kamery XBOX 3D Kinect V2 v prostredí ROS

Robot Operating System (ROS) je súbor softvérových knižníc a nástrojov, ktoré pomáhajú vytvárať robotické aplikácie od ovládačov, až po najmodernejšie algoritmy. [8]

Fungovanie ROSu sa zakladá na prepojovaní sietí procesov s centrálnym uzlom. Uzly môžu bežať na viacerých zariadeniach a k tomuto rozbočovaču sa pripájajú rôznymi spôsobmi. Hlavnými spôsobmi vytvárania siete je poskytovanie požadovaných služieb alebo definovanie spojení vydavateľ/predplatiteľ s inými uzlami. [9]

ROS sme využili na prepojenie kamery s počítačom a naším kódom. Konkrétne sme využili verziu ROS Noetic.

Kinect V2 kamera obsahuje RGB kameru a kameru, ktorá zachytáva informácie o hĺbke obrazu. Túto funkcionalitu môžeme využiť priamo na vytvorenie point cloudu a neskôr ďalej na jeho spracovanie.

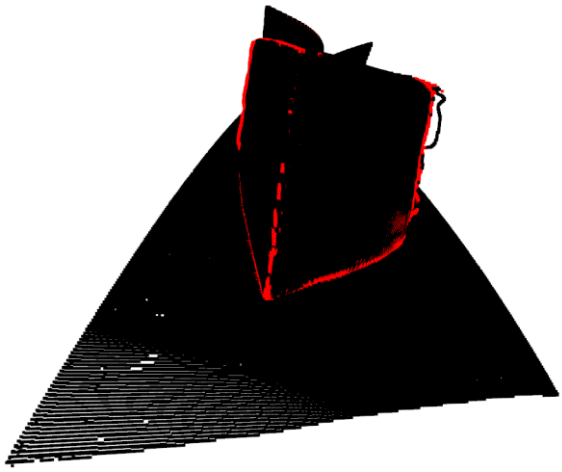


Obr. 5 Point cloud cez Kinect V2
Zdroj: [Autor]

3 Výsledky a diskusia

Po aplikovaní algoritmu detekcie hrán so vstupnými dátami (obr.1 a obr. 2) sme dostali červenou farbou vyznačené hrany point cloudu.

Algoritmus nefunguje presne podľa očakávaní z dôvodu rozdielu medzi vstupnými dátami kamery a vstupnými dátami obrazu. Pri detekcii hrán je dôležité poznamenať, že táto technika využíva zmeny intenzity svetla alebo farebné rozdiely medzi susednými pixelmi na identifikáciu hrán. V prípade hĺbkovej mapy môžu byť hrany nejasné alebo nedefinované, čo môže viesť k nepresným detekciám.



Obr. 6 Zobrazenie point cloudu s vyznačeným algoritmom detekcie hrán červenou farbou
Zdroj: [Autor]



Obr. 7 Vyznačené hrany point cloudu
Zdroj: [Autor]

Záver

V závere nášho článku sme identifikovali niekoľko kľúčových zistení, ktoré by mohli mať významný dopad na priemyselné aplikácie.

Prvým dôležitým zistením je skutočnosť, že implementácia algoritmu detekcie hrán z RGB obrázku a hĺbkovej mapy neprodukuje vždy očakávané výsledky, čo môže viesť k nepresnostiam vo výpočtoch a v konečnom dôsledku k nesprávnemu určeniu hrán objektov.

Taktiež sme podrobne opísali proces tvorby a upravovania point cloudu v 3D priestore na údajoch z internetu.

Okrem toho sme tiež zdôraznili dôležitosť práce s 3D kamerou a Robot Operating System (ROS) v našom projekte. Spojazdnenie 3D kamery, konkrétne modelu XBOX 3D Kinect V2, slúžilo na spracovanie farebného obrazu a jeho hĺbky, ktoré boli kľúčové na vytvorenie point cloudu (obr. 7).

Správna implementácia týchto technológií a 3D kamery môže viesť k zvýšenej efektivite a presnosti nášho systému automatizovaného výberu produktov v priemysle.

Použitá literatúra

[1] Piece Picking.[online].zivid.com.[2020-12-19]. Dostupné na internete: https://www.zivid.com/applications/piece-picking

[2] Robotic Piece and bin Picking.[online].bastiansolutions.com.[2023-03-22].Dostupné na internete: https://www.bastiansolutions.com/solutions/technology/industrial-robotics/goods-to-robot/

[3] Depth Maps: How Software Encodes 3D Space.[online].lookingglassfactory.com.[2023-01-19].Dostupné na internete: https://lookingglassfactory.com/blog/depth-map

[4] Point Cloud Processing.[online].mathworks.com.Dostupné na internete: https://www.mathworks.com/help/vision/point-cloud-processing.html

[5] Point Cloud-voxel downsampling.[online].open3d.org.Dostupné na internete: https://www.open3d.org/docs/0.8.0/tutorial/Basic/pointcloud.html

[6] What is the KNN algorithm?.[online].ibm.com.Dostupné na internete: https://www.ibm.com/topics/knn

[7] SIGMA RATIO.[online].documentation.help.Dostupné na internete: https://documentation.help/EPMA-Probe/gloss_sigmaratio.htm

[8] ROS – Robot Operating System.[online].ros.org.[2021].Dostupné na internete: https://www.ros.org/

[9] An Introduction to Robot Operating System: The Ultimate Robot Application Framework.[online].toptal.com.Dostupné na internete: https://www.toptal.com/robotics/introduction-to-robot-operating-system

Manažment elektrickej energie pomocou fotovoltických systémov

Management of electrical energy through photovoltaic systems

Pavol Lukačka[1]
Školiteľ: Marián Hosťovecký[1]
[1]Ústav počítačových technológií a informatiky, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Nám. J. Herdu 2, Trnava, 917 01
lukacka1@ucm.sk, hostovecky@ucm.sk

Abstrakt

Cieľom tohto príspevku je kvantifikácia a analýza problematiky, s dôrazom na poskytnutie usmernení pre optimalizáciu riadenia spotreby elektrickej energie v oblasti fotovoltických systémov. Usilujeme sa nielen o vytvorenie metodiky pre efektívnejšie riadenie spotreby a využitia prebytočnej energie získanej z fotovoltických systémov, ale aj o navrhnutie riešení na jej optimalizáciu, čím prispievame k zníženiu nákladov a zvýšeniu udržateľnosti a efektívnosti využívania obnoviteľných zdrojov energie. V práci sa tiež venujeme analýze ekonomických a technologických aspektov využitia prebytočnej energie a prezentujeme výsledky, ktoré podčiarkujú význam integrácie inteligentných riadiacich systémov do súčasných a budúcich fotovoltických inštalácií.

Kľúčové slová: fotovoltika, využitie prebytkov energie energetický manažment, obnoviteľné zdroje energie.

Abstract

The objective of this article is to quantify and analyze the issues, with an emphasis on providing guidelines for optimizing the management of electrical energy consumption in the field of photovoltaic systems. Our goal is not only to provide a methodology for more efficient management of consumption and utilization of surplus energy obtained from photovoltaic systems, but also to propose solutions for its optimization, thereby contributing to cost reduction and increasing the sustainability and efficiency of renewable energy sources. In our work, we also analyze the economic and technological aspects of utilizing surplus energy and present results that underscore the importance of integrating intelligent control systems into current and future photovoltaic installations.

Keywords: photovoltaics, surplus energy utilization, energy management, renewable energy sources.

Úvod

V dnešnom dynamicky sa meniacom prostredí je neustále narastajúci dopyt po cenovo dostupnej a ekologickej elektrickej energii. Fotovoltika sa stáva často preferovaným riešením tohto dopytu. Fotovoltické systémy predstavujú obnoviteľný zdroj energie, ktoré využívajú slnečné svetlo na výrobu elektriny prostredníctvom solárnych článkov. Slúžia ako obnoviteľný zdroj energie pre budovy, čím výrazne znižujú náklady na elektrickú energiu a prispievajú k zníženiu emisií skleníkových plynov. Napriek ich rastúcej popularite však existuje nezhoda medzi množstvom vyrobenej a spotrebovanej energie, ktorá často vedie k výskytu prebytkov energie počas slnečných dní. Táto situácia predstavuje kľúčovú výzvu v hľadaní udržateľných energetických riešení. Efektívne riadenie spotreby energie je esenciálne pre optimalizáciu využitia tejto zelenej energie, najmä v oblastiach, kde infraštruktúra distribučnej siete nie je dostatočne rozvinutá.

Fotovoltický systém pripojený do distribučnej siete môže byť klasifikovaný do dvoch hlavných kategórií:

- Ongrid:
  ide o typ systému, ktorý neobsahuje batériové úložisko a funguje na princípe dodávania vyrobenej elektriny priamo do elektroinštalácie budovy.

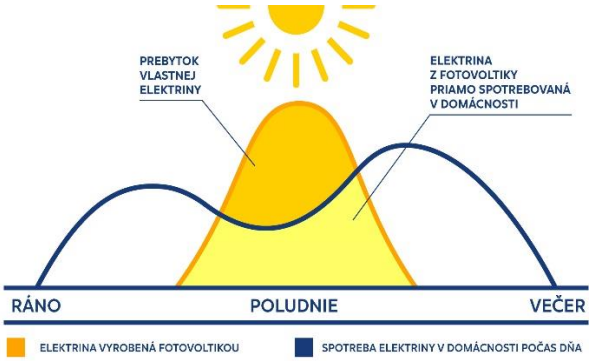
- Hybridný systém:
  je pokročilejší typ, ktorý disponuje batériami a integrovaným elektromerom, ktorý monitoruje spotrebu a dodávku energie. Tento systém je schopný skladovať nadbytočnú energiu do batérií v prípade, že spotreba je menšia ako produkcia.

Z hľadiska efektívnosti sú hybridné systémy výhodnejšie, pretože dokážu optimalizovať využitie vyrobenej energie. Avšak, z hľadiska návratnosti investície sa ongrid systémy môžu javiť výhodnejšie, hoci hybridné systémy môžu byť efektívnejšie v dlhodobom horizonte.

Tu však vzniká nevýhoda ongrid systémov, ktorou sú tzv. *Prebytky" elektrickej energie,* ktoré sa môžu vygenerovať počas slnečných dní. Väčšina majiteľov týchto systémov má problém využiť túto nadbytočnú energiu v plnej miere, pretože sa väčšinou jednoducho odovzdáva do distribučnej siete, kde ju môžu využiť iné odberné miesta. Vzhľadom na neustály nárast fotovoltických inštalácií však často dochádza k situácii, kedy sa táto 100% zelená energia nedokáže efektívne zužitkovať. Tento scenár je z hľadiska pohľadu majiteľov fotovoltických systémov ešte horší, pretože ich prebytky reprezentujú stratenú energiu. Jedným z následkov rastúceho počtu Fotovoltických zdrojov je aj zvyšovanie napätia v distribučnej sieti, ktoré ma za následok výpadky výroby, prípadne obmedzenie výkonu samotného fotovoltického zdroja. [6]

Túto problematiku sa rozhodli riešiť aj dodávatelia elektrickej energie, ktorí začali poskytovať službu, ktorá je nazývaná „*virtuálna batéria*". Ide v podstate o platenú službu, ktorá zaručuje, že ak vzniknú akékoľvek prebytky energie z fotovoltických systémov, tieto sa zaúčtujú do virtuálnej batérie. Neskôr, napríklad v noci, kedy fotovoltika nefunguje, majitelia môžu túto energiu znovu využiť prostredníctvom odberu z distribučnej siete a zaplatiť len poplatky za prenos cez distribučnú sústavu.

Toto riešenie však nie je dokonalé, pretože pomer ceny za energiu a ceny za distribúciu tvorí približne 40% ku 60%. To znamená, že ak fotovoltika dodala do distribučnej siete 10 kWh prebytkov, tak každá z tých 10 kWh energie je pri spätnom odbere zo siete približne o 40% lacnejšia ako pre tých, ktorí nevyužívajú službu virtuálnej batérie. Príklad fungovania virtuálnej batérie nájdete na obrázku č.1.



Obrázok 1 – princíp fungovania virtuálnej batérie
zdroj: sse.sk

Je vhodné, teda uviesť, že najefektívnejším spôsobom využitia fotovoltiky je spotrebovať energiu ihneď po jej vyrobení. Tento postup je relevantný nielen pre ongrid systémy, ale aj pre hybridné systémy, pretože vyrobená energia počas dňa často výrazne prekonáva 1 až 10-násobok inštalovanej kapacity batérie. V praxi to znamená, že batériové úložiská nie sú schopné efektívne zachytiť všetku vyrobenú energiu, čo je čiastočne spôsobené ich vysokou cenou a nedostatočnou návratnosťou. Niekedy návratnosť investície do batériového systému dokonca prekračuje životnosť samotnej batérie, čo znižuje ekonomickú atraktivitu tejto možnosti. [1]

1. Možnosti využitia prebytkov elektrickej energie z fotovoltického systému

Táto myšlienka nie je nová a v podstate existuje mnoho správnych odpovedí na túto otázku. Jedným z riešení je „preprogramovať" samotných používateľov, aby využívali energeticky náročné spotrebiče hlavne cez slnečné dni. Avšak toto nie je vždy možné dosiahnuť a často obmedzuje prevádzkovateľom zaužívané štandardy. Táto stratégia, založená na prispôsobení používateľského správania bez zásahu do energetického prebytku, predstavuje pasívne riadenie. Naopak, aktívne riešenia zahŕňajú zapínanie spotrebičov pri prebytku energie, čo je efektívnejšie, ale vyžaduje riešenie komplexných algoritmických výziev a rozhodovanie o tom, ktoré spotrebiče aktivovať. [6]

2. Výber vhodných spotrebičov pre aktívne riadenie prebytkami

Výber správneho spotrebiču je síce veľmi individuálna otázka, ale v reálnom svete sa ukazuje, že niektoré spotrebiče sú vhodnejšie na využitie prebytkov z fotovoltického systému ako iné. Tu je niekoľko typov spotrebičov, ktoré by bolo vhodné zvážiť:

- *Teplá voda*

systémy na ohrev vody, ako napríklad akumulačné nádrže môžu byť efektívnym spôsobom na využitie prebytku energie.

- *Elektrické vozidlá*

dobíjanie elektrických vozidiel je energeticky náročná činnosť kedy by prebytky mohli byť efektívne využité.

- *Klimatizácie a tepelné čerpadlá*

v prípade klimatizácií a tepelných čerpadiel je chladenie a vykurovanie tiež energeticky náročná činnosť, vhodná pre riadenie prebytkami.

3. Požiadavky pre riadenie elektrických spotrebičov prebytkami z FTVE systému

Aby sa zaistilo efektívne riadenie spotrebičov pri nadbytku energie získanej z fotovoltických systémov, je nevyhnutné brať do úvahy rôznorodosť spotrebičov a špecifické vlastnosti fotovoltických inštalácií. Pre dosiahnutie maximálnej efektivity a synergie pri využívaní obnoviteľnej energie je kľúčové zameranie na nasledujúce aspekty:

1.*Identifikácia prebytkov energie* - Systém by mal kontinuálne monitorovať produkciu a spotrebu energie. Na základe získaných dát by mal algoritmus posúdiť či je vhodné aktivovať konkrétne spotrebiče vzhľadom na aktuálny nadbytok energie. [6]

2.*Vyhodnotenie potenciálnych spotrebičov* - Systém by mal analyzovať charakteristiky jednotlivých spotrebičov a ich energetické požiadavky, aby určil najvhodnejší spôsob a dobu ich aktivácie, zvážiť by sa mala aj životnosť spotrebiču vzhľadom na časté zopnutie a vypnutie, ktoré môže nastať. [6]

3.*Priorizácia spotrebičov* - Spotrebiče by mali byť usporiadané podľa priority založenej na ich schopnosti využívať nadbytočnú energiu a na aktuálnych potrebách používateľa.

4.*Prispôsobenie preferenciám* - Používateľ by mal mať možnosť nastaviť svoje preferencie a obmedzenia pre riadenie spotrebičov, čím sa zabezpečí, že systém bude zohľadňovať osobné potreby a komfort. [3]

V ďalších častiach tohto príspevku sa podrobne venujeme týmto kľúčovým aspektom riadenia spotreby, pričom detailne rozoberáme body 1 až 4.

3.1 Proces extrakcie dát z fotovoltického meniču

Menič je zariadenie, ktoré transformuje jednosmerný prúd z fotovoltaických panelov na striedavý. Je možné ho považovať za srdce fotovoltického systému. Pre efektívnu identifikáciu prebytkov je nevyhnutné mať k dispozícii relevantné údaje o výrobe a spotrebe. Vzhľadom na to, že meniče už tieto údaje uchovávajú v pamäťových registroch, najjednoduchším spôsobom je ich extrahovať do potrebného hardvéru pre riadenie. Čo je odporúčané riešenie. [2]

3.2 Hardvérová stránka extrakcie

Pri pohľade na hľadisko hardvéru je proces extrakcie dát zložitý a zároveň kritický pre správne fungovanie systému. V našom prípade sa táto úloha zveruje mikrokontroléru ESP8266 Node MCU. Tento mikrokontrolér je zvlášť navrhnutý pre aplikácie Internetu vecí (IoT), čo z neho robí ideálny kandidát pre monitorovanie a riadenie fotovoltických systémov, na túto činnosť sa môže použiť aj akýkoľvek PLC systém.
Kľúčovou súčasťou mikrokontroléru ESP8266 Node MCU je jeho schopnosť komunikovať cez prevodník RS485. RS485 je štandardizovaný protokol na sériový prenos dát, ktorý sa často používa v priemyselných a automatizačných aplikáciách. V tomto prípade umožňuje prevodník RS485 spojenie s linkou využívajúcou Modbus protokol na prenos dát. Modbus je rozšírením komunikačným protokolom v priemysle, ktorý sa často využíva na získavanie údajov z rôznych zariadení.

Mikrokontrolér ESP8266 Node MCU je programovaný tak, aby pravidelne odchytával komunikáciu na linke pomocou Modbus protokolu. Tento proces sa opakuje v intervaloch 500 ms, čo zabezpečuje dostatočnú frekvenciu na získanie aktuálnych dát. [5]

3.3 Softvérová stránka extrakcie

Po softvérovej stránke je vhodné mikrokontrolér programovať prostredníctvom vývojového prostredia Arduino IDE a Implementovať komunikáciu s meničom prostredníctvom prevodníku RS485.
Samotné odchytávanie dát je vhodné riadiť cez funkcie, ktoré sú navrhnuté tak, aby čítali špecifikované registre podľa Modbus dokumentácie od výrobcu, v našom prípade to bola dokumentácia od meniča značky SofarSolar. Táto dokumentácia poskytuje detailné informácie o tom, ako čítať a interpretovať údaje z meniča. Príklad funkcií, ktorá zabezpečuje extrakciu dát, je napríklad funkcia: FetchSM_PtGridData.
Táto funkcia je zameraná na získavanie údajov o stave elektroinštalácie objektu s fotovoltikou vo wattoch. Znamienko premennej gridstate (+/-) indikuje či ide o dodávku alebo odber energie. [5]

Obrázok č.2 nižšie poskytuje reprezentáciu tejto funkcie v programovacom jazyku C++.

```
bool FetchSM_PtGridData(int &gridState) {
  uint8_t result;

  // Read ActivePower_PCC_Total register (0x0488)
  result = node.readHoldingRegisters(0x0488, 1);
  if (result == node.ku8MBSuccess) {
    int16_t pccPower = node.getResponseBuffer(0);
    // Convert to floating-point with the specified accuracy
    float pccPowerInKW = pccPower * 0.01;  //Gridstate in kW
    gridState = pccPower * 10;  // Gridstate in W
    return true;
  }
  return false;
}
```

Obrázok 2 – funkcia na extrakciu dát zo smart metru
zdroj: vlastná implementácia

3.5 Spotrebiče a efektivita ich riadenia

Pri identifikácii a klasifikácii spotrebičov je dôležité rozdeliť ich do dvoch základných kategórií: odporové záťaže a bežné záťaže.

Odporové záťaže predstavujú spotrebiče, ktorých spotreba energie môže byť efektívne regulovaná pomocou techniky pulznej modulácie šírky impulzov (PWM). Táto technika umožňuje presné riadenie energie do týchto spotrebičov podľa aktuálnych potrieb, čo zvyšuje ich potenciál použitia pre riadenie prebytkov. To zanemená, že ak prebytok je 1750W, tak do odporovej záťaže vieme presmerovať tento presný výkon. Na druhej strane sú bežné záťaže majú často presne stanovenú spotrebu energie, ktorá môže byť obmedzená technickými špecifikáciami daného spotrebiča alebo regulačnými požiadavkami. Napríklad, niektoré európske nabíjačky pre elektromobily (wallboxy) majú minimálny nabíjací výkon pohybujúci sa v rozhraní 1,4 - 4 kW, čo môže predstavovať obmedzenie, podobná situácia je aj s tepelnými čerpadlami a klimatizáciami, ktoré dokážu byť riadené signálom 0-10V, tiež ich výkon je buď presne definovaný alebo je regulačne daný po stupňoch. [2]

3.4 PWM riadenie / ON,OFF riadenie prebytkov

Implementácia PWM riadenia musí byť zameraná na vzorkovaciu periódu. Čím je táto perióda rýchlejšia, tým efektívnejšie je riadenie systému. Dáta z meniču sú aktualizované v systéme SofarSolar každých 500ms, v dôsledku obmedzenej rýchlosti komunikačnej linky.
Pri implementácii sa sleduje stav siete a ak sa zaznamená prebytok cez PWM signál, výkon sa reguluje tak, aby bol prebytok 0W.
Riadenie prebytkov pomocou ON/OFF spínania je menej efektívne v porovnaní s PWM riadením, pokiaľ je typ inštalovaného systému ongrid bez batérie, tak sa spínací spotrebič musí aktivovať len vtedy, keď prebytok prekročí definovaný príkon PWM spotrebiča. Napríklad, ak je prebytok 1750 W a máme spotrebič s príkonom 2000 W, nemožno ho aktivovať, pretože by to spôsobilo odber zo siete. Aktivácia je možná až v prípade, že prebytok prekročí 2000 W.

Existuje však aj tretia varianta riadenia, a to ON/OFF riadenie v hybridnom systéme s batériou. V tomto prípade je možné bez problémov aktivovať spotrebič s príkonom 2000W, aj keď je prebytok len 1750W, pretože batéria poskytne chýbajúcich 250W. V prípade, že kapacita batérie klesne pod vopred stanovenú úroveň SOC (state of charge – úroveň nabitia batérie), napríklad 95%, spotrebič sa jednoducho vypne, až kým prebytok nepresiahne 2000W alebo, kým batéria nedosiahne nabitie nad 95% SOC.

Správny systém na riadenie prebytkov by mal podporovať všetky 3 typy spomenutých typov riadenia, najväčší dopyt je, ale pre PWM riadenie z hľadiska efektivity.

3.6 Prioritizácia spotrebičov

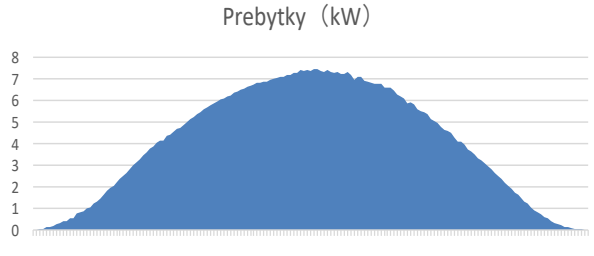
Inteligentné riadenie spotrebičov tzv. „*Prioritizácia*“ je kľúčom k maximálnemu využitiu prebytočnej energie získanej z fotovoltických systémov. Hlavným cieľom je zabezpečiť, aby sa táto energia využívala, čo najefektívnejšie, čo si vyžaduje premyslené určenie priority medzi spotrebičmi na základe ich schopnosti prispôsobiť sa variabilnej dodávke energie.

Prednostne by sa mali aktivovať zariadenia, ktoré sú schopné variabilného využitia energie a tým pádom efektívnejšie využívajú dostupný prebytok. To je dôležité aj v prípade hybridných systémov s batériami, kde je cieľom sa vyhnúť zbytočnému cykleniu batériového úložiska. Ideálne riadenie by malo kombinovať moduláciu šírky impulzov (PWM) s pevným príkonom určitých zariadení, ako napríklad využitie odporových prvkov s nastaviteľným príkonom cez PWM spolu so spotrebičmi, ktoré majú presne daný fixný výkon pre optimalizáciu spotreby.

Efektívne využitie prebytočnej energie by malo zahŕňať dynamický systém prioritizácie, ktorý reaguje na aktuálnu výrobu a spotrebu energie. V prípade, že výroba nepostačuje pre príkon všetkých obvodov, by sa malo prioritne využívať PWM riadenie na 100% absorpciu dostupnej energie. Pokiaľ výroba prekročí prah určený pre PWM, môže sa aktivovať zariadenie s pevným príkonom a prípadné ďalšie kolísavé prebytky nad definovaný prah môžu byť efektívne využité opätovne cez PWM obvod až, kým nedosiahnu kapacitu ďalšieho zariadenia s pevným príkonom. Takto navrhnutý systém umožňuje efektívnu absorpciu a využitie všetkej prebytočnej energie vďaka inteligentnej prioritizácii a adaptabilnej regulácii záťaže.

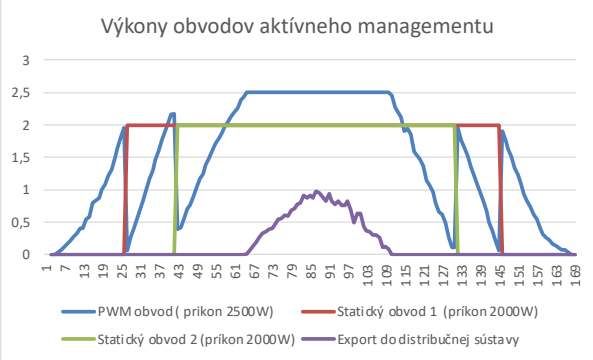
3.7 Grafické znázornenie prioritizácie:

Predpokladajme nasledovné prebytky fotovoltického systému v rámci slnečného dňa, kde pre lepšie pochopenie, je spotreba elektroinštalácie nulová. Vizuálu reprezentáciu nájdete na grafe č.1 nižšie.



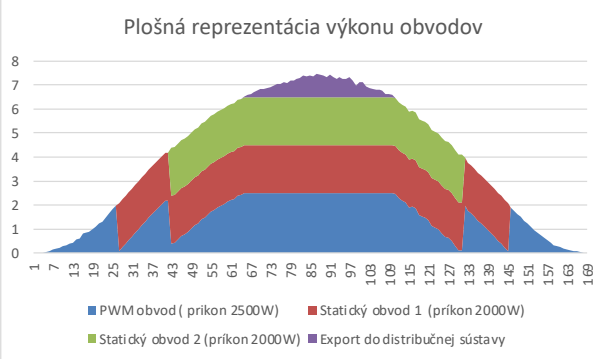
Graf 1 – Simulované prebytky fotovoltického systému v rámci dňa
Zdroj: vlastná simulácia

Systém aktívneho manažmentu s optimálne nastavenou prioritizáciu by mal fungovať na základe simulovaných prebytkov v grafe. č.2 nižšie:



Graf 2 – Výkon odobratý obvodmi aktívneho managementu

Graf č.2 sa dá reprezentovať aj plošne, kde táto reprezentácia predstavuje kumulatívny príspevok troch obvodov v priebehu času. Plochy sú na sebe naskladané, pričom každá farba reprezentuje iný obvod alebo práve zvyšné prebytky, ktoré museli byť preposlané do distribučnej sústavy (výkon prebytku bol väčší ako nominálny výkon spínaných spotrebičov). Plošnú reprezentáciu výkonu obvodov nájdete na grafe č.3 nižšie.



Graf 3– plošne zobrazený výkon odobratý obvodmi aktívneho managementu
zdroj: vlastná simulácia

3.8 Prispôsobenie používateľským preferenciám

Kľúčovým aspektom riadenia spotreby v systémoch založených na fotovoltike je aj prispôsobenie sa individuálnym preferenciám a potrebám používateľov. Používatelia by mali mať možnosť personalizovať, ako sa s ich spotrebičmi zaobchádza pri riadení prebytkovej energie, zohľadňujúc nasledujúce faktory:

1. Nastavenia komfortu: Poskytnúť možnosti nastavenia, ktoré reflektujú preferovaný komfort používateľov, ako sú napríklad teplotné rozsahy pre klimatizácie, alebo tepelné čerpadlá alebo ohrevu teplej vody, používateľ systému pre aktívny management by mal mať možnosť nastaviť si podmienky spínania tak, aby vyhovovali práve jeho potrebe. Pretože napríklad pokiaľ nesú prebytky, tak by používateľ mal mať zabezpečený alternatívy prístup k zopnutiu a využívaniu spínaných spotrebičov, pokiaľ je to nevyhnutné buď cez softvérové rozhranie daného zariadenia na aktívny management alebo prostredníctvom hardvérového riešenia. [4]

2. Interaktívne rozhrania: Rozvoj používateľského rozhrania (UI) pre systém aktívneho managementu je kľúčová vec, ktorá by umožnila jednoduchú konfiguráciu a monitorovanie riadenia energie a spotrebičov. Tento systém by zabezpečil, že používateľ má detailnú štatistiku o tom, ako zariadenie fungovalo, prípade informácie v reálnom čase, čo zariadenie na aktívny management práve robí. [4]

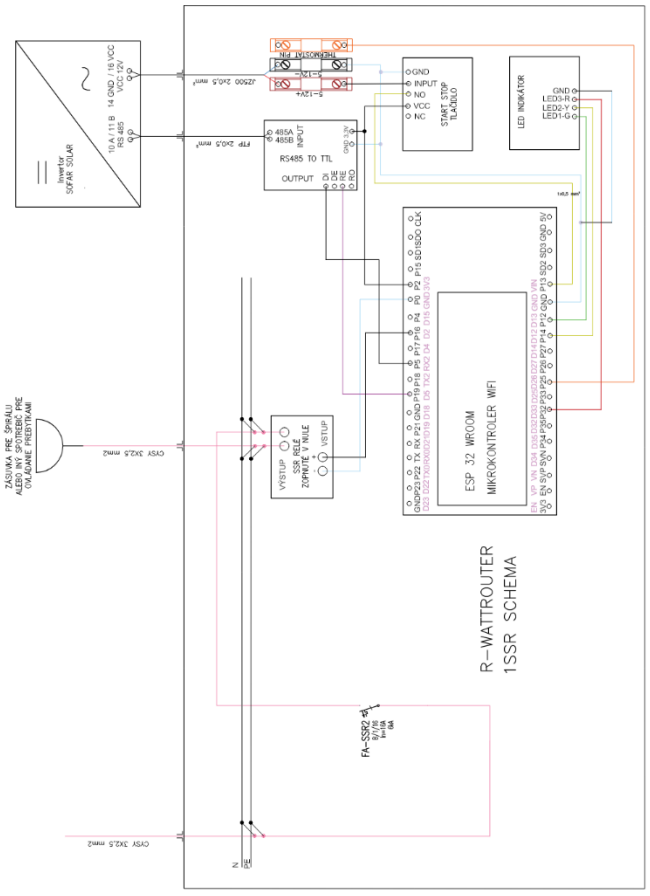
Integráciou týchto prispôsobení do systémov fotovoltiky sa zabezpečí, že riadenie spotreby bude nielen efektívne z hľadiska využívania energie, ale bude tiež v súlade s individuálnymi potrebami a preferenciami koncových používateľov, čím sa zvyšuje celková spokojnosť a prijatie týchto systémov. [6]

4. Hardvérová implementácia zariadenia na využitie prebytkov.

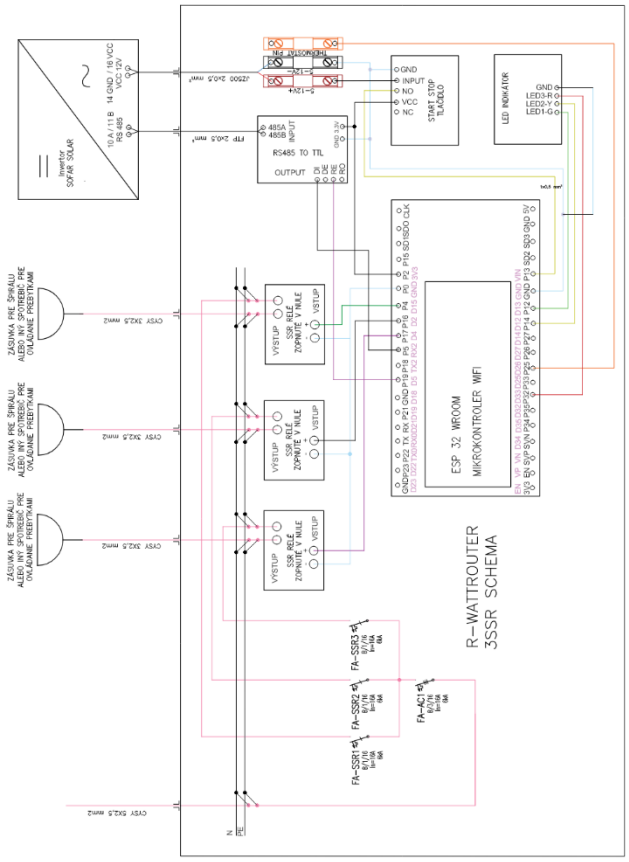
Pri implementácii hardvéru sme zvolili systém zameraný na splnenie väčšiny požiadaviek a cieľov. Vyvinuli sme dve hardvérové konfigurácie: prvá zabezpečuje reguláciu bojleru s jednou špirálou a druhá ohrev akumulačnej nádrže s tromi špirálami. Pre konfiguráciu s tromi špirálami používame 12-modulový rozvádzač, zatiaľ, čo pre bojler s jednou špirálou postačí 8-modulový rozvádzač. Oba rozvádzače majú ochranu IP65, čo umožňuje ich inštaláciu do vlhkých prostredí. Trojšpirálová konfigurácia využíva na napájanie trojfázový päťvodičový kábel CYSY s prierezom 2,5 mm². Konfigurácia pre bojler využíva jednofázový trojvodičový kábel CYSY. Tento kábel je chránený prostredníctvom jednofázového ističa B16A, zatiaľ, čo trojfázový kábel má ochranu prostredníctvom trojfázového ističa B20, kde jednotlivé špirály sú dodatočne chránené jednofázovými ističmi B16A.

Z reléových výstupov sú vedené vodiče do jednofázových trojvodičových káblov CYSY s prierezom 2,5 mm², ktoré sú ukončené v spínacích zásuvkách pre spotrebiče. Nulový a ochranný vodič PE sú pripojené podľa schémy TN-S, pričom v rozvádzačoch sú oddelené mostíky pre nulový a PE vodič. Spínacie signály pre SSR relé dodáva mikrokontrolér Arduino node MCU s logickým napätím 3,3V, napájaný 12V DC z komunikačného portu meniča. Týchto 12V je prevádzaných na 5V DC pred pripojením na svorky mikrokontroléra. Komunikácia s meničom prebieha cez rozhranie RS485 A/B, ktoré je v rozvádzači prevedené na sériovú TTL komunikáciu, prostredníctvom ktorej mikrokontrolér komunikuje. Na obrázku č.3 a č.4 nižšie nájdete schému zapojenia tohto zariadenia, pričom na obrázku č.5 a č.6 uvidíte fotografiu zhotoveného zariadenia.

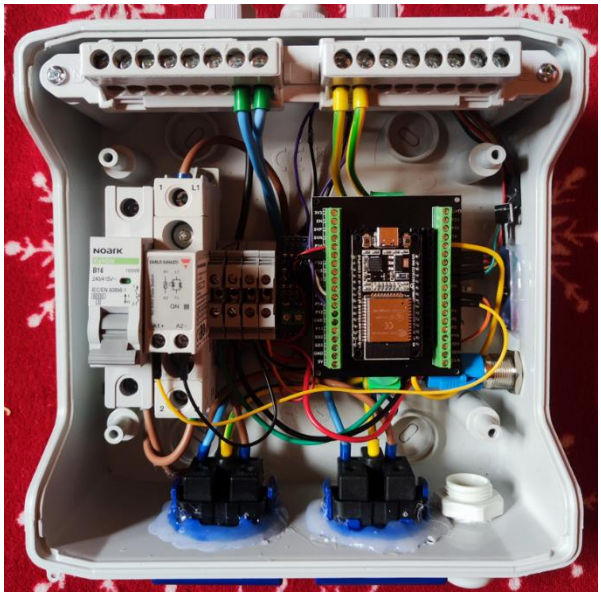
Schéma zapojenia



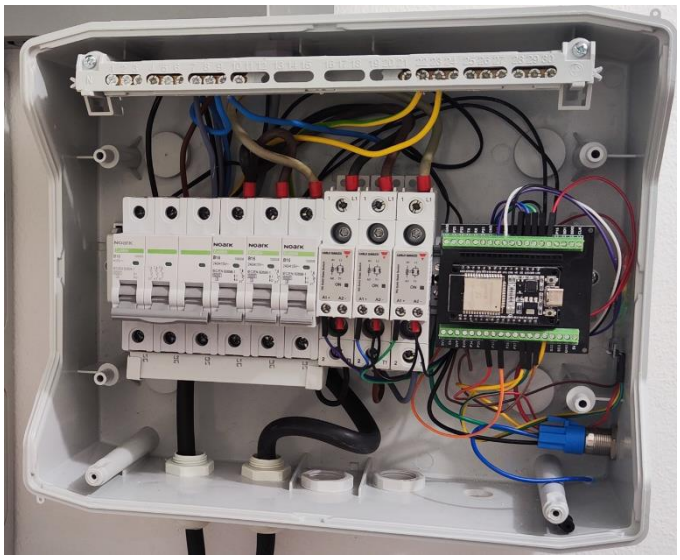
Obrázok 3 – schéma zapojenia zariadenia na využitie prebytkov pre jeden obvod
Zdroj: vlastný návrh AutoCAD



Obrázok 4 – schéma zapojenia zariadenia na využitie prebytkov pre tri obvody
Zdroj: vlastný návrh AutoCAD



Obrázok 5 – fotka zariadenia - varianta pre jeden spotrebič
Zdroj: vlastná fotografia



Obrázok 6 – fotka zariadenia - varianta pre tri spotrebiče
Zdroj: vlastná fotografia

5. Softvérová implementácia

Na úrovni softvéru bol vyvinutý algoritmus, ktorý dynamicky riadi elektrické spotrebiče na základe aktuálneho stavu fotovoltického systému. Algoritmus, ktorý je súčasťou programu nahratého do mikrokontroléra, používa PWM signál na riadenie výkonu pripojených odporových zariadení (napríklad ohrievača alebo iného spotrebiča). To umožňuje flexibilné využívanie prebytočnej energie bez potreby ukladania do batérií. Daný algoritmus v celku nájdete v prílohe tohto príspevku.

V kóde sú stanovené intervaly na vzorkovanie dát z elektrickej siete, pričom sa každých 500 milisekúnd kontroluje prebytok v sieti. Na základe týchto údajov sa následne vypočítava potrebný výkonový cyklus pre spotrebič. Kód upravuje šírku impulzov PWM v reálnom čase a zohľadňuje rýchlosť zmeny stavu siete, čo znamená, že môže rýchlo reagovať na zmeny v produkcií a spotrebe energie.

Softvérová implementácia zahŕňa funkciu FetchSM_PtGridData, ktorá číta dáta z meniča a aktualizuje stav siete v reálnom čase. Potom, ako sa určí množstvo prebytočnej energie, algoritmus upraví powerPercentage, čo je percentuálny podiel výkonu, ktorý má spotrebič spotrebovať.
Táto hodnota sa dynamicky mení s ohľadom na požiadavky siete a termostatu, čo umožňuje zachovať energetickú bilanciu bez odberu z distribučnej siete.

Funkcia updateDurations v kóde následne vypočíta doby zapnutia a vypnutia SSR relé, ktoré priamo ovplyvňujú výkon dodávaný spotrebiču. Tieto časy sú odvodené od vypočítaného powerPercentage a sú proporčne rozdelené do intervalov, v ktorých je relé zapnuté alebo vypnuté. Toto riadenie zabezpečuje, že pri vysokom percente powerPercentage je relé viac času v stave ON, čo znamená vyšší dodávaný výkon, zatiaľ, čo pri nižšom percente je relé viac času v stave OFF, čím sa zníži dodávaný výkon. Na obrázku č.7 a č.8 nižšie nájdete túto funkciu a princíp zvyšovania výkonu už ako implementáciu v programovacom jazyku C++.

```
void updateDurations() {
  float onCycles = (powerPercentage / 100.0) * totalCycles;
  onDuration = onCycles * cycleDuration;
  offDuration = (totalCycles - onCycles) * cycleDuration;
}
```

Obrázok 7– funkcia updateDurations
Zdroj: screenshot – vlastná implementácia

```
// Calculate the scaling factor based on the distance from the lower limit
const int lowerLimit = 50;
const float maxScaleFactor = 10.0;
float distanceFromLowerLimit = max(0, gridState - lowerLimit);
float scaleFactor = 1 + (distanceFromLowerLimit / (maxScaleFactor * lowerLimit));
scaleFactor = min(scaleFactor, maxScaleFactor);
scaleFactor *= adjustmentFactor;

// Adjust powerPercentage based on gridState and scaleFactor
if (gridState > lowerLimit) {            // Excess power available
  powerPercentage += 0.5 * scaleFactor;  // Increase power percentage
} else {
  powerPercentage -= 0.5 * scaleFactor;  // Decrease power percentage
}
```

Obrázok 8 – zvyšovanie a znižovanie výkonu spotreby
Zdroj: screenshot – vlastná implementácia

Tento inteligentný systém riadenia umožňuje nie len optimalizáciu spotreby prebytočnej energie, ale aj jej prispôsobenie v reálnom čase na základe aktuálnej potreby systému a termostatických požiadaviek. Celý program je napísaný a optimalizovaný pre platformu Arduino, využívajúc jednoduché, ale účinné programovacie techniky pre dosiahnutie požadovaného správania systému.

V našej softvérovej implementácii je tiež zahrnutá možnosť pripojenia termostatu, ktorý slúži na kontrolu teploty vody. Táto funkcia je veľmi dôležitá, pretože umožňuje systému zabezpečiť, že voda nebude studená, akonáhle dosiahne spodný teplotný limit, a to aj v prípade, že nie je dostupný žiaden prebytok energie z fotovoltického systému. Na obrázku č.9 nižšie nájdete implementáciu funkcie termostatu.

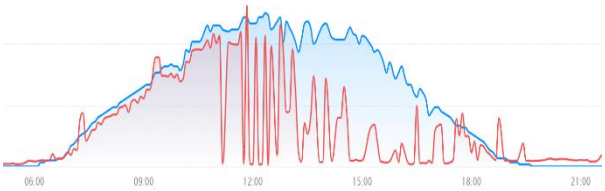
```
// Check if the thermostat is demanding heat
if (thermostatState == LOW) {
  Serial.println("Thermostat is demanding heat.");
  powerPercentage = 100;
}
```

Obrázok 9 – funkcionalita termostatu
Zdroj: screenshot – vlastná implementácia

V kóde je k tomuto účelu definovaný digitálny vstup označený ako THERMOSTAT, ktorý číta stav termostatu. Ak termostat indikuje, že teplota vody klesla pod nastavený limit, systém reaguje zapnutím spotrebiču, a to aj napriek tomu, že v systéme práve neexistuje prebytok energie. Tento mechanizmus zabezpečuje, že teplota vody/vykurovaného prostredia zostáva v požadovanom rozsahu pre komfort a bezpečnosť používateľa.

Pripojenie termostatu a jeho interakcia so systémom PWM je dôležitou súčasťou celkového riadiaceho algoritmu. Keď je termostat vo stave LOW, indikuje to, že požiadavka na teplo je aktívna. V tom prípade algoritmus nastaví powerPercentage na 100%.

Systém neustále monitoruje termostat a okamžite reaguje na zmeny v teplotných požiadavkách. Týmto spôsobom sa udržuje teplota vody na požadovanej úrovni nezávisle od aktuálnej produkcie fotovoltického systému.



Obrázok 10 – vizualizácia funkcionality – deň č.1
Zdroj: screenshot – solarman portál

Celková softvérová infraštruktúra je navrhnutá tak, aby poskytovala flexibilnú, škálovateľnú a udržateľnú platformu pre efektívne využívanie obnoviteľných zdrojov a inteligentné riadenie spotrebičov.

Výsledky a diskusia

Testovanie bolo vykonané na fotovoltaickej inštalácii s kapacitou 10 kWp počas intervalu 48 hodín. Pri použití meniča SofarSolar HYD 10KTL-3PH s nominálnym výkonom 10 kW sme zaznamenali, že počas dni s vysokou intenzitou slnečného žiarenia dochádzalo k produkcii výrazného množstva prebytočnej energie.

Navrhnuté zariadenie demonštrovalo schopnosť efektívnej adaptácie na dynamické podmienky energie generovanej fotovoltaickou elektrárňou. Jeho algoritmy pre zapínanie a vypínanie spotrebičov boli optimalizované tak, aby sa zaistilo, že všetok prebytok energie je využitý priamo v mieste inštalácie bez potreby odberu z distribučnej siete. Tento proces bol podrobne sledovaný a overený cez monitorovací portál, ktorý je poskytovaný distribučnou spoločnosťou.

Analýza výsledkov testovania ukázala, že naše zariadenie nie len zabraňuje plytvaniu energiou, ale tiež riadi spotrebu s vysokou presnosťou. To umožňuje nielen maximalizáciu využitia vyrábanej obnoviteľnej energie, ale tiež výrazne prispieva k energeticky udržateľným a ekonomicky efektívnym riešeniam pre domácnosti a podniky. Zároveň sa tým otvára priestor pre zníženie ekologickej stopy a podporu energetického prechodu k obnoviteľným zdrojom energie, čo sú kľúčové kroky smerujúce k ochrane našej planéty pre budúce generácie. Na obrázku č.10 a č.11 nájdete grafické zobrazenie spotreby a výroby fotovoltiky.



Obrázok 11– vizualizácia funkcionality – deň č. 2
Zdroj: screenshot – solarman portál

Na predložených vizualizáciách (obr10, obr.11) sú zobrazené grafy, kde sa časový priebeh energie odvíja v rozmedzí od 6:00 do 21:00 hodiny. Modrá krivka ilustruje množstvo energie generovanej fotovoltaickým systémom, kým červená krivka indikuje mieru spotreby tejto energie.

Priebeh červenej krivky konzistentne zostáva nižšie než trajektória modrej, čo poukazuje na fakt, že v skoro každom momente počas dostatočnej výroby bola spotreba energie rovnaká alebo nižšia než jej produkcia. Čas kedy spotreba bola vyššia, ako výroba indikuje zapnutie spotrebičov v domácnosti s väčším príkonom, ako je výroba fotovoltiky, v takej situácií je výkon nášho zariadenia totožný s nulou, nakoľko chceme zabezpečiť, aby fungovalo zariadenie len z prebytkov fotovoltickej elektrárne. Z tohto dôvodu možno usudzovať, že naša technológia účinne zvláda

reguláciu spotreby tak, aby vždy zodpovedala dostupnej prebytočnej energie. Príkladom efektívnosti systému je jeho činnosť v ranných a večerných hodinách, kedy je spotreba energie prirodzene nižšia a naše zariadenie pružne reaguje na zmeny v produkcií tak, aby nedochádzalo k vyhadzovaniu energie do distribučnej siete. To potvrdzuje, že naše zariadenie plní svoju funkciu a prispieva k inteligentnému manažmentu a optimalizácii energetických zdrojov.

Záver

Náš príspevok preukázal, že efektívne riadenie prebytkovej energie generovanej fotovoltickými systémami je možné a prakticky realizovateľné s použitím navrhnutého riadiaceho zariadenia. Testy zariadenia preukázali jeho schopnosť adekvátne reagovať na prebytky energie a využívať ich napríklad pre lokálne vykurovacie potreby bez nutnosti odberu energie z distribučnej siete. Týmto prístupom sa dá výrazne prispieť k efektívnejšiemu využívaniu fotovoltických systémov, zníženiu operatívnych nákladov a zlepšeniu ekologickej udržateľnosti energetického hospodárstva. Vďaka tomuto prístupu sa otvárajú nové možnosti pre inteligentné riadenie energetických systémov, ktoré môže v budúcnosti prispieť k lepšej integrácii obnoviteľných zdrojov do distribučnej sústavy a zvýšiť energetickú nezávislosť koncových používateľov.

Použitá literatúra:

Na spísanie tohto príspevku boli analyzované nasledovné články na základe, ktorých sme obdržali potrebné vedomosti na vyhotovenie algoritmu, nadobudnuté teoretické znalosti z daných článkov sme sumarizovali v tomto príspevku:

[1] D. Kuznetsov, A. Kupin, I. Muzyka and Y. Kumchenko, "Improving the Structure of Intellectual WattRouter for Optimize Self-Consumption of Energy Produced by Solar Panel," *2018 International Scientific-Practical Conference Problems of Infocommunications. Science and Technology (PIC S&T)*, Kharkiv, Ukraine, 2018, pp. 1-6, doi: 10.1109/INFOCOMMST.2018.8632146.

[2] Kavaliauskas, Ž., Šajev, I., Blažiūnas, G., Gecevičius, G., & Čapas, V. (2023). The concept of a hybrid data transmission network with a mobile application intended for monitoring the operating parameters of a solar power plant. Applied Sciences (Basel, Switzerland), 13(6), 3545. https://doi.org/10.3390/app13063545

[3] Abdelsalam, Y. M. E. (2023). Development of a mobile application for grid - tied solar photovoltaic (PV) system design for residential buildings. Journal of Mechanical, Civil and Industrial Engineering, 4(2), 18–24. https://doi.org/10.32996/jmcie.2023.4.2.3

[4] Abdelsalam, Y. M. E. (2023). Development of a mobile application for grid - tied solar photovoltaic (PV) system design for residential buildings. Journal of Mechanical, Civil and Industrial Engineering, 4(2), 18–24. https://doi.org/10.32996/jmcie.2023.4.2.3

[5] Javadi, M. S., Gough, M., Lotfi, M., Esmaeel Nezhad, A., Santos, S. F., & Catalão, J. P. S. (2020a). Optimal self-scheduling of home energy management system in the presence of photovoltaic power generation and batteries. Energy (Oxford, England), 210(118568), 118568. https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.118568

[6] Thiaux, Y., Dang, T. T., Schmerber, L., Multon, B., Ben Ahmed, H., Bacha, S., & Tran, Q. T. (2019). Demand-side management strategy in stand-alone hybrid photovoltaic systems with real-time simulation of stochastic electricity consumption behavior. Applied Energy, 253(113530), 113530. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.113530

Rozhodovanie riadenia procesov NPC prostredníctvom umelej inteligencie v nástroji GOAP

Decision making of NPC process control via artificial intelligence in GOAP

Adam Mečíř[1]
Školiteľ: Marián Hosťovecký[1]
[1]Ústav aplikovanej informatiky, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
adam.mecir@ucm.sk, marian.hostovecky@ucm.sk

Abstrakt
Cieľom uvedeného článku bolo vytvoriť funkčný prototyp agentov (NPC) založených na GOAP architektúre, čo predstavuje systém umelej inteligencie pre agentov určených pre implementáciu v digitálnych hrách. Konkrétne ide o spôsob aktivity (činnosti) vedľajších postáv, ktoré nie sú ovládané hráčom, ale primárne prostredníctvom algoritmu, ktorý je založený na určitom vzore resp. súbore správania sa. Navrhovaný prototyp bol aplikovaný na príklade riadenia stredovekého mesta ku vzťahu k okolitým osadám (účelovo zameraných na vybrané činnosti).

Kľúčové slová: NPC, GOAP

Abstract
This paper aimed to create a prototype of agents (NPCs) based on the GOAP architecture, which is an artificial intelligence system focused on agents in digital games. Specifically, it is a way of activity (actions) of side characters that are not controlled by the player, but through an algorithm that is based on a certain pattern or set of behaviors. The proposed prototype has been applied to the example of the management of a medieval town to the surrounding settlements (purposely focused on selected activities).

Keywords: NPC, GOAP

Úvod

Je náročné, a nejednoznačné definovať pojem umelá inteligencia. Pokiaľ však vyberáme z množstva autorov, ktorý sa danej problematike venujú, rozhodli sme sa pre definíciu podľa A. Turinga. Ten AI chápe, ako počítačové stroje s inteligenciou korelujúcu s ľudskou inteligenciou. V rámci jeho navrhnutého Turingovho testu, možno stroj považovať za inteligentný, ak ho nestranný pozorovateľ v rozhovore nerozozná od človeka. V modernom jazyku sa umelá všeobecná inteligencia vzťahuje na schopnosť stroja komunikovať, uvažovať a samostatne pracovať v známych aj nových scenároch podobným spôsobom ako človek. Táto schopnosť zostáva ďaleko za rozsahom súčasných metód a nie je tým, o čom sa hovorí, keď sa bežne používa pojem "umelá inteligencia". Väčšina odkazov na umelú inteligenciu sa v súčasnosti často používa ako zameniteľný pojem so "strojovým učením" alebo "hlbokým učením", pričom druhé menované je špecifickou formou strojového učenia, o ktorej sa podrobnejšie hovorí ďalej. Strojové učenie sa vzťahuje na algoritmy a štatistické modely, ktoré sa učia z označených tréningových údajov, z ktorých sú schopné rozpoznávať a odvodzovať vzory. Podľa Makridakis (1995) možno konštatovať, že v uplynulom desaťročí sa objavilo množstvo predpovedí o nadchádzajúcej revolúcii umelej inteligencie (AI) a jej vplyve na všetky aspekty našej spoločnosti, firiem a života vo všeobecnosti. To by znamenalo rozsiahle zmeny, ktoré ovplyvnia spôsob nakupovania, získavania služieb, práce, vzdelávania a zábavy.

K problematike a chápaniu AI sa vyjadril aj Shevlin et al. (2022), ktorí chápu pod pojmom umelá inteligencia obdobie prelomových objavov zameraných na objavovanie tzv. umelých systémov, ktoré sa vyrovnajú ľudskej inteligencii alebo ju prekonajú. Fei-Fei Li (2020) chápe umelú inteligenciu taký systém, ktorý je schopný transformovať svet a môže donútiť stroje k mysleniu na úrovni ľudí.

Vývoj a progres AI zasiahlo aj do herného priemyslu a tvorby digitálnych hier. Umelá inteligencia (AI) v digitálnych hrách predstavuje fascinujúci spojovník medzi pokročilými technológiami a tvorivým vývojom, ktorý otvára nové možnosti pre dizajn hrateľnosti, interakciu s hráčom a tvorbu pútavých príbehov. Použitie AI v hrách umožňuje vývojárom vytvárať nehrateľné postavy (NPC), ktoré sa správajú a reagujú na hráčove akcie v realistickom a dynamickom prostredí, čím značne rozširujú hranice tradičného programovania a dizajnu hier.

Eric Schmidt - "Umelá inteligencia je kľúčovým prvkom našej digitálnej budúcnosti."

Jedným z kľúčových dôvodov, prečo je vhodné využívať možnosti prostredí určených na vývoj NPC, je schopnosť AI adaptovať sa a reagovať na nekonečnú škálu situácií a rozhodnutí hráčov, čím sa vytvára hlbší a viac zapojený zážitok. Táto adaptabilita znamená, že hráči môžu čeliť jedinečným a nepredvídateľným výzvam, ktoré zlepšujú hodnotu hry a podporujú rôznorodé spôsoby hrania.

Umelá inteligencia si našla v hernom priemysle svoje významné postavenie predovšetkým v takých oblastiach, ako sú:

- *NPC*: Umelá inteligencia môže byť implementovaná do NPC na vytvorenie realistického správania, reagovania na hráča a prispôsobovania sa herným situáciám.
- *Rozhovory a správanie*: Možno využiť na vylepšenie dialógov a správania postáv v hre, aby sa zdali autentickejšie a lepšie interagovali s hráčom.
- *Personalizácia*: Umelá inteligencia môže sledovať hráčove preferencie a prispôsobovať hru na základe individuálnych úrovní obťažnosti, nastavení a preferencií hráča.
- *Optimalizácia výkonu*: Umelej inteligencii možno poveriť úlohou optimalizácie grafiky, nastavenia hardvéru a siete na základe špecifikácií hráčových zariadení a pripojenia.
  Generovanie questov: Umelej inteligencii môže byť zverená úloha generovania rozmanitých a zaujímavých úloh, misií a výziev pre hráčov.
- *Zlepšovanie herných mechaník*: Vďaka umelej inteligencii implementovanej do hry môže byť herná mechanika prispôsobená tak, aby bola hra pútavejšia, náročnejšia a zábavnejšia.

Správanie NPC: AI umožňuje vytvárať neherné postavy (NPC) s dynamickým a realistickým správaním, ktoré inteligentne reagujú na akcie hráča v hernom svete.

Systémy dialógov: Dialógové systémy riadené umelou inteligenciou môžu poskytovať pohlcujúcejšie a kontextuálne konverzácie, čím sa posilňuje aspekt rozprávania príbehu v hrách.

Procedurálne generovanie obsahu: Algoritmy umelej inteligencie môžu generovať rôznorodý a dynamický herný obsah, ako sú krajiny, úrovne a úlohy, čím sa zabezpečí pútavejší a nepredvídateľnejší herný zážitok.

Adaptívna obťažnosť: AI dokáže analyzovať výkon hráčov a upravovať obťažnosť hry v reálnom čase, čím zabezpečuje náročný, ale príjemný herný zážitok pre hráčov všetkých úrovní zručností.

Dynamické herné prostredie: Simulácie riadené umelou inteligenciou môžu vytvárať dynamické a citlivé herné prostredia, ktoré sa vyvíjajú na základe interakcií hráčov, čím sa zvyšuje celkový realizmus herného sveta.

1 Charakteristika systému GOAP

Goal-Oriented Action Planning (GOAP) môžeme charakterizovať, ako pokročilý systém plánovania používaný v umelej inteligencii pre videohry a simulácie, ktorý umožňuje nehrateľným postavám (NPC) dynamicky generovať sériu akcií na dosiahnutie špecifických cieľov. Na rozdiel od tradičných metód pevne kódovaného správania, GOAP pracuje na princípe flexibilného rozhodovacieho mechanizmu, kde každá postava vyhodnocuje svoj súčasný stav a definované ciele, aby identifikovala najefektívnejšiu cestu k ich dosiahnutiu.

Tento prístup umožňuje NPC adaptovať sa na meniace sa prostredie a rozhodnutia hráča, poskytujúc tak plynulý a realistický herný zážitok. GOAP systémy sú zvlášť cenné za ich schopnosť modelovať komplexné správanie s minimálnym vstupom od dizajnérov, čo umožňuje vytvárať presvedčivé a inteligentné NPC, ktoré reagujú na širokú škálu herných situácií.

Architektúra GOAP sa zakladá na niekoľkých kľúčových komponentoch:

- akciách,
- stavoch a
- plánovači.

Každá akcia v GOAP má definované predpoklady (stavy, ktoré musia byť splnené pred jej vykonaním) a efekty (zmeny stavu, ktoré akcia spôsobí). Stavy sú reprezentácie rôznych aspektov herného sveta a vnútorných atribútov NPC, ako sú zdravie, poloha alebo vlastníctvo predmetov. Plánovač potom analyzuje súčasný stav sveta a ciele NPC, aby vytvoril sekvenčný plán akcií, ktoré NPC prevedú z ich súčasného stavu do stavu, kde sú ich ciele splnené.

Jadrom systému GOAP je algoritmus A* alebo iné metódy vyhľadávania v grafe, ktoré sú použité na optimalizáciu hľadania najefektívnejšej cesty akcií vedúcej k cieľu. Tento proces zahŕňa iteratívne hodnotenie možných akcií na základe ich predpokladov a efektov, s výberom tej, ktorá najviac približuje NPC k

ich cieľu pri minimálnych nákladoch. Architektúra GOAP tak poskytuje robustný a flexibilný rámec pre modelovanie komplexného správania NPC, umožňujúc vývojárom a dizajnérom hier vytvárať hlboké a interaktívne herné prostredia.

2. Komparácia vybraných rozhodovacích systémov založených na AI

V uvedenej kapitole sa venujeme problematike komparácie vybraných rozhodovaných systémov založených na AI. Spomedzi širokého spektra vyberáme GOAP a behaviorálne stromi. V rámci toho vyberáme konkrétne aspekty (viď tab.1). Skôr ako prejdeme ku komparácii, považujeme za vhodné charakterizovať pojem GOAP a behaviorálne stromy.

GOAP - GOAP je metóda umelej inteligencie, ktorá sa používa v hernom vývoji na riadenie správania NPC (Non-Player Character) alebo agentov.
Tento prístup sa zameriava na dosiahnutie konkrétnych cieľov (goals) pomocou plánovania postupnosti akcií (actions), ktoré vedú k dosiahnutiu týchto cieľov.
GOAP vytvára plány akcií dynamicky na základe aktuálnej situácie a stavu prostredia, čím umožňuje adaptáciu správania NPC na meniace sa podmienky.

Behaviorálne stromy - Behavioral Trees, často označované ako BT, sú hierarchické stromy, ktoré sa používajú na modelovanie a riadenie správania NPC alebo agentov v hernom prostredí.
Tieto stromy obsahujú uzly, ktoré reprezentujú rôzne správania alebo akcie, ako aj podmienky na vyhodnotenie ďalších krokov v strome.
Behaviorálne stromy poskytujú štruktúrovaný spôsob definovania a riadenia správania NPC a sú vhodné pre implementáciu rôznych typov rozhodovacích procesov a priorít.

Tabuľka1: Porovnanie GOAP a Behaviorálne stromy

Aspekt	Behaviorálne stromy	GOAP
Princíp fungovania	Hierarchická štruktúra s uzlami reprezentujúcimi akcie	Plánovanie cieľov a akcií na základe aktuálnych stavov
Reprezentácia	Stromová štruktúra s uzlami pre podmienky a akcie	Množina stavov a akcií, ktoré vedú k dosiahnutiu cieľa
Rozhodovací proces	Rozhodovanie pomocou uzlov v strome a prioritou ich vykonávania	Dynamické generovanie plánu na dosiahnutie cieľa
Flexibilita	Vhodné pre situácie s jednoduchším rozhodovacím procesom	Vyhodnocuje a prispôsobuje plány na základe situácie
Zložitosť	Môže sa stať zložitejším a ťažko spravovateľným pre veľké stromy	Často je jednoduchší a transparentnejší pre komplexné scenáre
Účinnosť	Pri menšom počte uzlov môže byť efektívne a rýchlo vyhodnocované	Efektívne pre plánovanie cieľov v rozsiahlych a dynamických prostrediach
Zameranie	Časté v prípade reaktívneho správania a situácií s prioritami	Ideálny pre situácie, kde sú ciele dôležité a prostredie sa často mení
Príklady použitia	Umelá inteligencia NPC v akčných hrách, jednoduchšie rozhodovacie procesy	Simulácie, stratégie, herné prostredia so zložitými a dynamickými cieľmi

3. Predstavenie navrhovaného modelu NPC na príklade stredovekého riadenia mesta a osád

V nasledujúcich podkapitolách si priblížime nami navrhovaný model založený na problematike NPC v digitálnych hrách.

3.1 Charakteristika cieľa a vstupných požiadaviek

Cieľom navrhovaného modelu založeného na NPC (nehrateľných postáv) bola tvorba dynamického a interaktívneho ekonomického systému v rámci digitálnej hry, ktorý simuluje realistické obchodné vzťahy medzi obyvateľmi štyroch dedín a jedného mesta. Každá z týchto dedín sa špecializuje na výrobu jednej z kľúčových surovín - dreva, železa, chleba a kameňa - ktoré sú nevyhnutné pre rozvoj a prosperitu herného sveta. Cieľom bolo vytvoriť systém, v ktorom NPC majú definované profesie a úlohy, ktoré prispievajú k ekonomike herného sveta prostredníctvom výroby, predaja a distribúcie týchto surovín.

V rámci vstupných požiadaviek kladených na vývoj stredovekého mesta a jeho fungovania ku vzťahu k osadám, sme si pred samotným začiatkom stanovili nasledovné vstupné požiadavky, kladené na to, ako majú mesto a okolité osady spravovať svoje činnosti (ekonomika....). Medzi tieto vstupné požiadavky patria:

- stredoveké mesto
- osady podľa remeselnej činnosti (farma – pestovanie obilia, drevo výroba, ťažba kameňa, ťažba železa)
- GOAP pre implementáciu NPC
- Ekonomický systém
- Vzájomné prepojenie osád
- Systém cieľov a plánovania

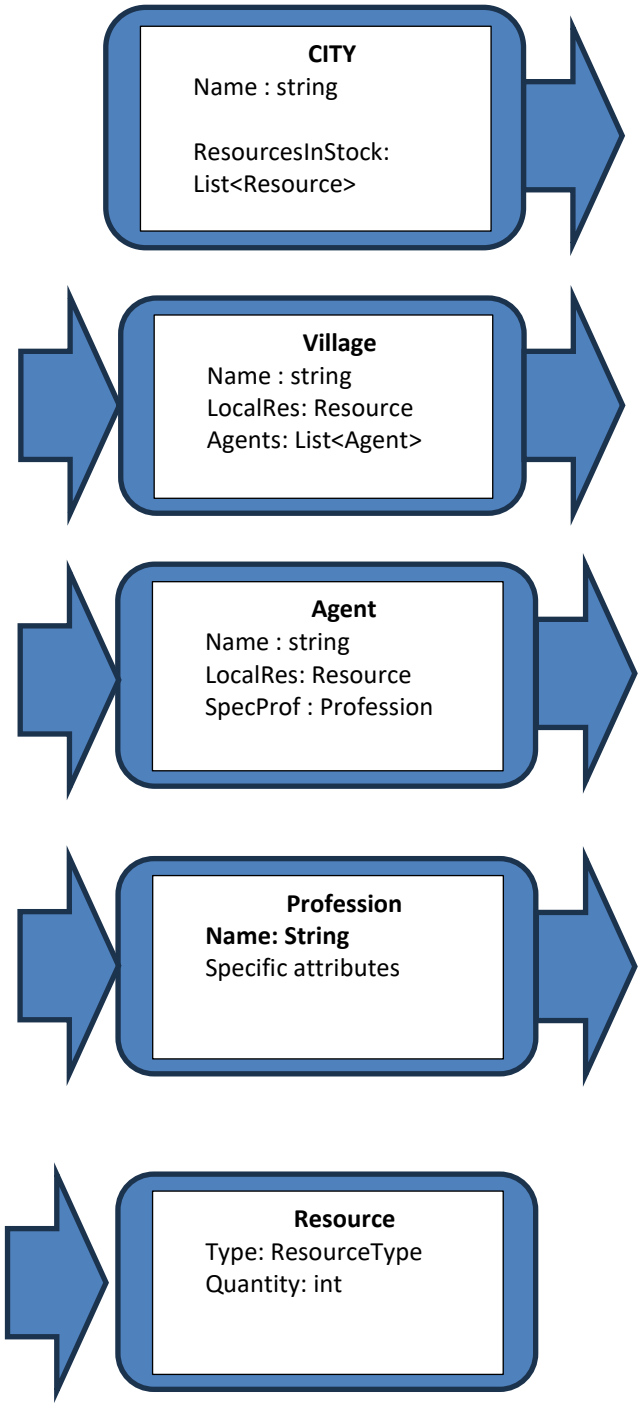
3.2 Nástroje a prostredia

Unity + assety + grafika

Nami navrhovaný prototyp bol realizovaný s využitím 3D herného engine Unity, čo umožnilo modelovanie komplexných interakcií medzi NPC a dynamické spravovanie ekonomických transakcií. Dôvod prečo sme sa rozhodli pre engine Unity bol ten...

Každé NPC bolo navrhnuté s unikátnou profesiou a schopnosťou produkovať, kupovať alebo predávať špecifické suroviny. Tento prístup umožnil simuláciu realistického ekonomického prostredia, v ktorom sú suroviny vyrobené v jednej dedine predávané lokálnym obchodníkom a následne distribuované do mesta. Mesto potom slúžilo ako centrálny distribučný bod, odkiaľ sa suroviny rozposielali do ostatných dedín, kde tieto suroviny chýbali.

3.3 Návrh



Graf 1: UML diagram
Zdroj : Vlastná tvorba

V danom UML Diagrame (Graf 1) sme vychádzali z logiky založenej na znovuobnoviteľnosti ktorá spočíva v kolobehu získavanie potrebných zdrojov na chod simulovaného prostredia vytváraného pomocou agentov riadeným systémom GOAP.

Náš model bol navrhnutý za účelom prepojenia zberu nutných zdrojov ktoré sa následne dokázali cez obchodné cesty prepraviť do miest kde ich je nedostatok . Mesto samotné predstavuje určitý spojovník cez ktoré sa následne rozhoduje množstvo ktoré sa predáva do dedín . každá dedina má k dispozícii špecifickú surovinu (1 zo 4) a ostatok získava už zmienenými obchodnými cestami

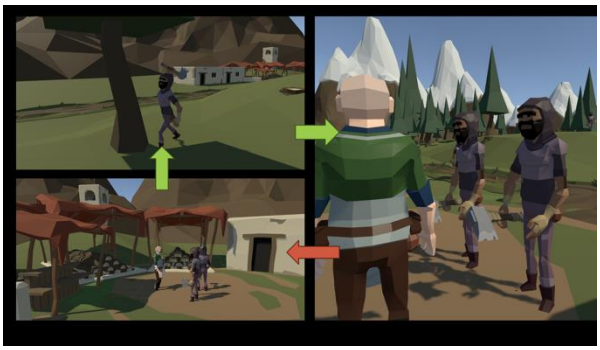
3.4 Implementácia

Pri vývoji prototypu som sa zameral na vytvorenie modulárneho a rozšíriteľného systému, ktorý by mohol byť ľahko upravený alebo rozšírený v budúcnosti. Tento cieľ som dosiahol vďaka flexibilite, ktorú ponúka Unity v kombinácii s pokročilými skriptovacími možnosťami v jazyku C#. Systém bol navrhnutý tak, aby umožňoval jednoduchú integráciu nových NPC, surovín a ekonomických mechanizmov bez potreby zásadných zmien v existujúcom kóde.

Pri modelovaní ekonomických transakcií som využil objektovo orientované programovacie paradigmy, čo umožnilo každému NPC držať si vlastný inventár a sledovať individuálne ekonomické ciele. Systém predaja a distribúcie surovín bol navrhnutý tak, aby odrážal ponuku a dopyt v rámci herného sveta, čo pridávalo hre ďalšiu vrstvu stratégie a plánovania.



Obr.1: Kolobeh profesie farmár
Zdroj: vlastná tvorba



Obr.2: Kolobeh profesie drevorubač
Zdroj: vlastná tvorba

Agenti podľa svojho zamerania postupujú akcie pre zber , prerobenie a predaj surovín (Obr1 a Obr2) s ktorými sa neskôr manipuluje ďalej čím sa tvorí prostredie

3 Výsledky a diskusia

S použitím systému GOAP sa nám podarilo vytvoriť simulačné prostredie ktoré bez zásahu hráča dokáže udržiavať sebestačné meniace sa prostredie ktoré sa mení ekonomicky sebestačne a pri každom spustení sa prostredie rozlične mení.

Záver

V tomto článku sme sa zameriavali na vytvorenie funkčného prototypu nehráčskych postáv (NPC) založených na architektúre Goal-Oriented Action Planning (GOAP). GOAP predstavuje systém umelej inteligencie navrhnutý pre agentov určených na implementáciu v digitálnych hrách. Naša pozornosť bola konkrétne zameraná na definovanie správania vedľajších postáv, ktoré nie sú ovládané hráčmi, ale operujú prostredníctvom algoritmu založeného na preddefinovaných vzoroch správania. Navrhovaný prototyp sme úspešne aplikovali na simuláciu riadenia stredovekého mesta vzhľadom na okolité osady, pričom každá osada bola špecializovaná na konkrétne činnosti. Naša práca prispieva k rozvoju AI-riadeného vývoja hier a poskytuje náhľady do praktickej aplikácie agentov založených na GOAP v komplexných virtuálnych prostrediach.

Poďakovanie

V prípade, že príspevok má vzťah k riešeniu projektu s grantovou podporou, uveďte túto skutočnosť podľa požiadaviek poskytovateľa podpory. Prípadné poďakovanie školiteľovi a konzultantom práce.

Použitá literatúra

[1] Schmidt, E. (2018). *Umelá inteligencia je kľúčovým prvkom našej digitálnej budúcnosti.* [Online] Dostupné na: https://www.researchgate.net/profile/Milan-Gregor/publication/280553214_Umela_inteligencia_explozia_inteligencie_a_technologicky_pokrok/links/55c36ee908aeca747d5f3c84/Umela-inteligencia-explozia-inteligencie-a-technologicky-pokrok.pdf

[2] Du-Harpur, X., Watt, F. M., Luscombe, N. M., & Lynch, M. D. (2020). What is AI? Applications of artificial intelligence to dermatology. *The British Journal of Dermatology*, *183*(3), 423–430. https://doi.org/10.1111/bjd.18880

[3] Makridakis, S. (1995). The forthcoming information revolution. *Futures*, *27*(8), 799–821. https://doi.org/10.1016/0016-3287(95)00046-y

Softvérový systém pre správu voľných parkovacích miest

Software system for management of free parking slots

Martin Schmidt[1] – Michal Vagač[1]
Školiteľ: Michal Vagač[1]
[1]Katedra informatiky, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica,
mschmidt4@student.umb.sk, michal.vagac@umb.sk

Abstrakt
Témou práce je vytvoriť viacvrstvovú aplikáciu, ktorej úlohou bude sledovať stav obsadenosti parkoviska. Toto je docielené pomocou kamery, ktorá zachytáva parkovisko a neurónovej siete, ktorá analyzuje obraz a dodá aplikácii správny stav obsadenosti jednotlivých miest.

Súčasťou je samozrejme aj klientska strana (frontend) kde bude mať používateľ možnosť zaevidovať vlastnú kameru po dohode s administrátorom, súčasne aj sledovať obsadenosti každého parkoviska. Samozrejme je potreba implementovať aj serverovú časť (backend), ktorá bude komunikovať s klientskou časťou a samotnou neurónovou sieťou.

Na vývoj klientskej strany je použitý framework Angular verzie 16 spolu so šablónou štýlov Bootstrap CSS. Serverová časť je vyvíjaný v jazyku Javaf s použítím frameworku Spring Boot. Databázový systém je PostreSQL, využívame relačnú databázu.

Kľúčové slová: inteligentné parkovisko, detekcia voľných parkovacích miest, viacvrstvová aplikácia

Abstract
The topic of the paper is to create a multi-layered application, the task of which will be to monitor the occupancy status of the parking lot. This is achieved with the help of cameras that capture the parking lot and a neural network that analyzes the image and provides the correct occupancy status of individual spaces.

There is also a client side (frontend), where the user will have the ability to register his own camera after agreement with the administrator, and can at the same time monitor the occupancy of each parking lot.
It is also necessary to implement the server side (backend), which will communicate with the client side and the neural network itself.

For frontend development we use the Angular framework version 16 together with the Bootstrap CSS stylesheet. The backend is developed in Java using the Spring Boot framework. The database system is PostreSQL, so we use a relational database.

Keywords: intelligent parking lot, detection of free parking spaces, multi-layered application

Úvod

Inteligentné parkovanie je parkovacia stratégia, ktorá spája technológiu a ľudské inovácie v snahe využiť čo najmenej zdrojov – ako je palivo, čas a priestor – na dosiahnutie rýchlejšieho, jednoduchšieho a hustejšieho parkovania vozidiel po väčšinu času, keď zostanú nečinné. [1]

Existujú už systémy ktoré problematiku inteligentného parkovania riešia, avšak väčšina z nich je veľmi komplexná, a finančne nákladná.

Cieľom tejto práce je vyvinúť systém ktorý bude spravovať, alebo kontrolovať, parkovacie miesta na danom parkovisku s použitím jednej kamery umiestnenej na mieste s dobrou viditeľnosťou celého parkoviska. O rozpoznávanie sa postará neurónová sieť trénovaná na fotkách daného parkoviska v rôznych stavoch.

1 Existujúce technológie

V súčasnosti najrozšírenejší systém parkovania je s pomocou závor a platobných terminálov/ snímačov kariet (Ďalej závorový systém). Týmto spôsobom sa dá jednoducho odsledovať počet voľných miest na parkovisku inkrementálnym odpočítavaním a pripočítavaním premennej podľa príchodu a odchodu áut cez závory. Avšak tento systém neumožňuje zistiť obsadenosť konkrétnych miest alebo sektorov parkoviska. O niečo modernejšie a komplexnejšie riešenie je pomocou systému MagSense.



Obr. 1 Závorový systém [2]

„Riešenie MagSense pre Smart Parking je založené na systéme senzorov na detekciu magnetického poľa, ktoré odosielajú údaje cez internet do Smart Parking Cloud. V rámci tohto riešenia je sprístupnená aj mobilná aplikácia Front end pre koncových užívateľov. Riešenie MagSense spoľahlivo rozpozná každé obsadené parkovacie miesto alebo čas, kedy sa dané parkovacie miesto opäť uvoľní. Zaznamenáva sa presný čas každej zmeny obsadenosti parkovacieho miesta a každé príliš dlhé zotrvanie na parkovacom mieste je možné nahlásiť, preto je určené aj pre otvorené parkoviská v meste. Systém MagSense prenáša presné údaje o voľných parkovacích miestach v reálnom čase pomocou robustnej konštrukcie a stáleho pripojenia na internet. Údaje je možné použiť na navigáciu vodičov pomocou mobilnej aplikácie k najbližšiemu voľnému parkovaciemu miestu, čím sa zníži premávka vozidiel hľadajúcich parkovacie miesto a zvýši sa plynulosť premávky. Aplikácia bola vyvinutá pre mobilné zariadenia so systémom Android a iOS a je bezplatne dostupná na Google Play alebo App Store. MagSense je senzor, ktorý využíva magnetické pole a radarovú technológiu, ktorá funguje pomocou adaptívneho kontrolného a expertného systému. Logika rozhodovania zabezpečuje presnosť miery detekcie na viac ako 98 %.“ [3]

MagSense je veľmi presný a spoľahlivý parkovací systém, avšak vyžaduje značne vyššiu investíciu ako klasický závorový systém kvôli množstvu infraštruktúry ktorú je potrebné zaviesť aby systém mohol fungovať. Tento systém však ale ponúka možnosť zistenia obsadenosti konkrétnych miest, čo závorový systém nedokáže. Problém infraštruktúry sa pokúša vyriešiť nasledujúci systém Parquery.

Inteligentný parkovací systém spoločnosti Parquery využíva učiace sa algoritmy na analýzu snímok nasnímaných existujúcimi kamerami na parkoviskách a poskytuje výsledky v reálnom čase. Poskytovaním informácií v reálnom čase umožňuje Parquery manažérom alebo obsluhe parkovísk dozvedieť sa viac o obsadenosti svojich parkovísk pre lepšiu optimalizáciu a zvýšenie zisku. Rovnako aj správcovia miest a samosprávy využívajú riešenie na to, aby svojim obyvateľom poskytli lepšie alternatívy parkovania a zlepšenie kvality života. Samozrejmosťou je aj prepojenie s navigačnými tabuľami. Systém taktiež umožňuje spoluprácu s mobilnými aplikáciami ktoré majú za úlohu vyberať poplatky za parkovanie. Inteligentné parkovacie riešenie od Parquery využíva kamery a umelú inteligenciu (AI) na monitorovanie parkovísk. Inteligentné algoritmy bežia buď v cloude alebo lokálne na parkovisku a detegujú vozidlá na záberoch kamier a zisťujú, či sú jednotlivé parkovacie miesta obsadené. Systém ihneď po spustení dosahuje 95% presnosť detekcie, po následnom odladení na konkrétne podmienky sa presnosť pohybuje okolo 99% [4].

Toto riešenie sa spolieha na softvér, konkrétne umelú inteligenciu (AI) tým pádom drasticky zníži cenu zavedenia systému, stačí kamera. K tomuto riešeniu sa snažíme priblížiť.

2 Návrh systému inteligentného parkoviska

Čo sa týka serverovej strany aplikácie je cieľ pomerne jednoduchý. Ako prvé je treba implementovať spôsob registrácie a prihlasovania pre užívateľov a systém rolí.

Systémový administrátor má prístup ku kódu aj ku každej zóne, a každej kamere. Taktiež má za úlohu sprevádzkovať nasadenie kamery do nášho systému a dohliadať na proces učenia neurónovej siete.

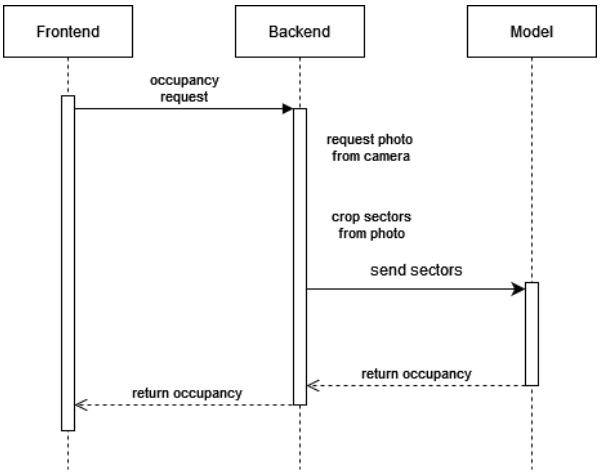
Regionálny administrátor sa stará o kamery jemu sprístupnené, pracuje len v rámci aplikácie. Tiež sa podieľa na procese učenia ale len minimálne. Spravidla to je niekto poverený zákazníkom.

Bežný používateľ má prístup jedine sledovať stavy jednotlivých parkovísk.

Po zaradení kamery do systému (bližšie popísaný v kapitole klientska strana), nastáva proces vytvárania datasetu, v našom prípade fotografií parkoviska. Serverová časť si postupne ukladá fotografie zachytené z kamery pre účel strojového učenia neurónovej siete. Tento proces trvá niekoľko dní až týždňov. Následne sa pomocou Polygon objektov zadaných regionálnym administrátorom vyrežú dôležité sekcie (parkovacie miesta) z fotografie. Tieto sekcie musia byť manuálne označené značkou „Obsadené“ alebo „Voľné“. Akonáhle máme pripravený dataset, môže začať proces učenia (bližšie popísaný v kapitole Neurónová sieť). Po

úspešnom vytrénovaní je ďalším krokom nasadenie modelu.

Teraz je jedinou úlohou serverovej časti pravidelne posielať údaje o obsadenosti naspäť na klientsku stranu.



Obr. 2 Schéma komunikácie

Najprv si klientska strana vypýta informácie o obsadenosti, následne si serverová časť vypýta fotografiu aktuálneho stavu parkoviska. Fotografia sa oreže na sektory podobne ako v procese tvorby datasetu a zašle na analýzu do modelu. Model zhodnotí každý sektor a zašle späť výsledky. Výsledky sa dajú do formy matice a zašlú sa späť na klientsku stranu, ktorý vykreslí stav parkoviska podľa spomínanej matice.

2.1 Klientska strana

Klientska časť aplikácie bude mať jednoduché rozhranie. Jednou z úloh rozhrania je jednoducho a efektívne komunikovať stav parkoviska pre používateľa. Ďalšia úloha spočíva v zmysluplnom priradení kamery do nášho systému.

Celý tento proces začína emailovou komunikáciou so systémovým administrátorom, ktorý zákazníkovi (alebo osobe ním poverenej) priradí rolu regionálneho administrátora a vytvorí zónu ku ktorej kamera patrí. Tejto osobe sa sprístupní na základe jeho role časť v ktorej vyplní údaje o kamere. Táto časť pozostáva z polí na vyplnenie údajov nachádzajúcich sa na ľavej strane, objektu Canvas ktorý slúži na zaznačenie parkovacích miest t.j. sektorov, a zoznamu vytvorených sektorov pre prípad ich úpravy alebo odstránenia. Administrátor začne vypĺňovať údaje, akonáhle vyplní zdroj kamery, na pozadí Canvasu sa zobrazí fotografia parkoviska zachytená z kamery. Následne môže administrátor vyznačiť sektory a zakončiť tento proces odoslaním údajov. Teraz sa kamera na serverovej časť vytvorí a pokračuje proces tvorby datasetu. Regionálny administrátor má vždy možnosť zmeny údajov kamery alebo sektorov, musí však rátať s tým že po zmene je potrebný značný čas na adaptáciu systému.

3. Implementácia

V tejto časti si podrobne opíšeme implementáciu databáz a používateľského rozhrania.

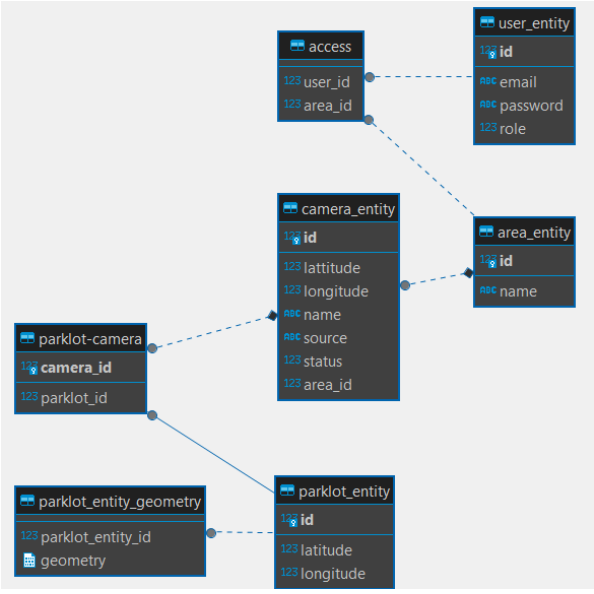
3.1 Databáza

Štruktúra databázy je založená na štyroch hlavných tabuľkách: camera, area, user a parklot (Obr. 3).

Tabuľka camera obsahuje základné údaje o kamere, konkrétne: zemepisná šírka a dĺžka, názov, zdroj, stav a ID zóny v ktorej sa nachádza. Zdrojom je myslená IP adresa alebo odkaz, ktorým sa pristupuje na kameru. Pomocou area_id je táto tabuľka spojená väzbou many-to-many s používateľmi, ktorí majú k nej prístup.

Tabuľka user (Obr.3) obsahuje údaje o samotných používateľoch, konkrétne: emailová adresa, hash hesla a rolu. Rola administrátora je prideľovaná systémovým administrátorom, predvolená rola je bežný používateľ.

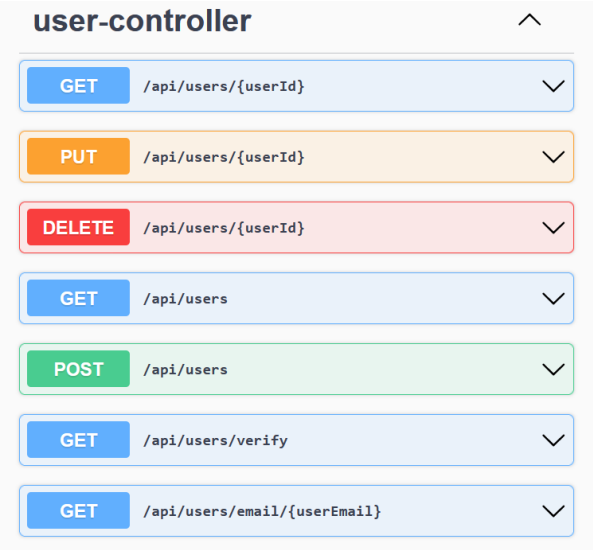
Tabuľka parklot reprezentuje jednotlivé parkovacie miesta na parkovisku. Jej obsahom je zemepisná šírka, dĺžka a pole bodov z ktorých serverová časť vytvorí Polygon pri orezávaní. Táto tabuľka je spojená väzbou many-to-one s tabuľkou camera, keďže jedno parkovisko má viac parkovacích miest.



Obr. 3 Schéma databázy

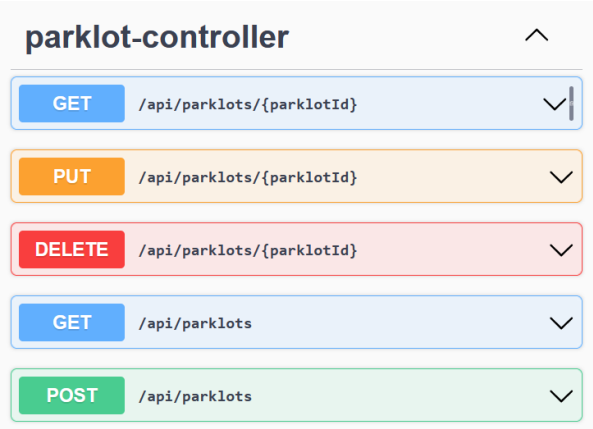
3.2 REST Endpointy

Aktuálne sú v serverovej časti implementované základné REST endpointy (Obr.4) na vytváranie, upravovanie, mazanie a získavanie údajov v databáze. Používateľská časť obsahuje aj získavanie používateľa podľa emailovej adresy a verifikáciu hesla.

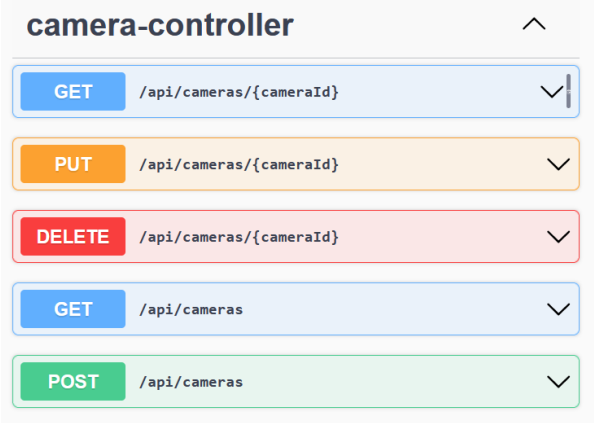


Obr. 4 User endpointy

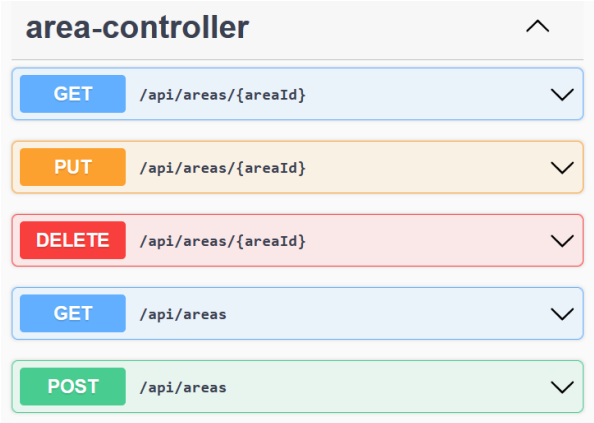
Pri verifikácií sa posiela špeciálny data transfer objekt s emailom používateľa a zadaným heslom (Obr.5,Obr.6 a Obr.7).



Obr. 5 Parklot endpointy



Obr. 6 Camera endpointy



Obr. 7 Area endpointy

Momentálne je táto funkcionalita testovaná formou posielania requestov cez platformu na testovanie API (napr. Postman), keďže vývoj klientskej strany stále prebieha.

3.3 Neurónová sieť

Samotná klasifikácia obsadenosti parkovacieho miesta je implementovaná pomocou konvolučnej neurónovej siete (CNN) - modelu TensorFlow Inception-ResNet-v2. Využitiu tejto siete na klasifikáciu voľných parkovacích miest sa venuje práca [5].

Pred samotným trénovaním siete je kľúčový zber a príprava dát. Ako bolo uvedené vyššie, zo snímok kamery sa vyrežú časti s jednotlivými parkovacími miestami – takto vznikne z jednej fotografie niekoľko (jednotiek až desiatok - podľa konkrétneho parkoviska) malých obrázkov s jednotlivými parkovacími miestami. Aby nebolo trénovanie závislé od mierky alebo natočenia, dáta sú ešte pred trénovaním normalizované (na rovnakú veľkosť a orientáciu).

Pri používaní aplikácie sa natrénovanej sieti odošle rovnako normalizovaný obrázok s neznámym stavom a sieť rozhodne, či je miesto voľné alebo obsadené. Túto informáciu serverová časť posunie ďalej klientskej strane na zobrazenie používateľovi.

Záver

V článku sme prezentovali problematiku inteligentných parkovísk a navrhli sme viacvrstvovú aplikáciu na sledovanie obsadenosti parkovísk s využitím kamier a neurónových sietí. Popísali sme implementáciu systému, ktorý zahŕňa registráciu a prihlasovanie používateľov, správu kamier a vytváranie datasetov pre strojové učenie neurónových sietí.

Náš systém bude umožňovať jednoduché a efektívne sledovanie stavu obsadenosti parkovísk pre používateľov. Ďalej sme prezentovali architektúru serverovej časti vrátane štruktúry databázy, ktorá umožní efektívne ukladanie informácií o kamerách a parkovacích miestach.

Ďalším krokom bude implementácia klientskej strany, ktorý bude poskytovať užívateľom jednoduché a intuitívne rozhranie na sledovanie stavu obsadenosti parkovísk a správu kamier. Klientska strana bude zabezpečovať aj komunikáciu s serverovou časťou a zobrazovanie informácií o obsadenosti parkovísk v reálnom čase.

V ďalšej časti našej práce sa budeme venovať implementácii klientskej strany a jeho integrácii s službami serverovej časti. Budeme sa snažiť vytvoriť užívateľsky prívetivé rozhranie, ktoré bude efektívne spolupracovať s ostatnými časťami nášho systému.

Použitá literatúra

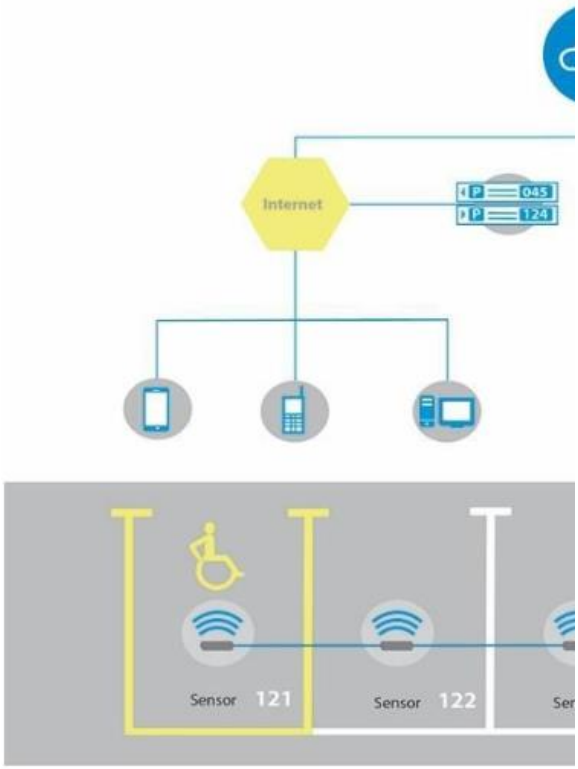
[1] WESSEL, Paul, What is Smart Parking? [online] Parksmart, 2016 [cit. 2023-4-8] Dostupné z: https://parksmart.gbci.org/what-smart-parking

[2] Parkovacie systémy, Dopravné systémy [online] DPPS s.r.o. [cit. 2023-4-10] Dostupné z: http://www.dpps.sk/parkovacie_systemy.html

[3] PRÍLOHA A - Špecifikácia Aplikačného riešenia, Vybavenia a Služieb [online] ÚVO, ---- [cit. 2023-4-10] Dostupné z: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiI_oae2qH-AhURRvEDHdd6DSAQFnoECB4QAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.uvo.gov.sk%2Fvyhladavanie-dokumentov%2Fdocument%2F3203050%2Fcontent%2F1283058%2Fdownload&usg=AOvVaw0J8CRuYsjZMopWbkIZAmG2

[4] Správa obsadenosti parkovísk pomocou systému Parquery [online] Gemtech, 2022 [cit. 2023-4-9] Dostupné na: https://www.gemtech.eu/index.php/cs/blog/post/sprava-parkovisk-pomocou-kameroveho-systemu-parquery

[5] SCHÖN, Jakub. 2017. Systém automatickej detekcie vol'ných parkovacích miest : diplomová práca. Banská Bystrica : Fakulta prírodných vied, Univerzita Mateja Bela, 60s.



Obr. 8 Štruktúra káblového systému MagSense [3]



Obr. 9 Ukážka Parquery systému [4]

Chatboty a Power Virtual Agents na univerzitách

Chatbots and Power Virtual Agents in Universities

Dana Stepanenko[1] – Vladimír Siládi[1]
Školiteľ: Vladimír Siládi[1]
[1]Katedra informatiky, KI FPVUMB, Tajovskeho 40, 974 09, Banská Bystrica,
dstepanenko@student.umb.sk, vladimir.siladi@umb.sk

Abstrakt
V súčasnosti vysokoškolské inštitúcie čelia rastúcemu dopytu po efektívnej podpore študentov a pedagógov. Tento článok sa zameriava na implementáciu chatbotov s využitím Microsoft Power Virtual Agents (PVA) ako nástroja na podporu helpdesku na vysokých školách. Článok sa zaoberá aj procesom výberu optimálnej platformy na vytvorenie chatbota. Microsoft Power Virtual Agents sa ukázal ako jeden z najvhodnejších nástrojov vďaka svojej flexibilite a integrácii s existujúcimi systémami.
Kľúčové slová: chatbot, helpdesk, automatizácia, Microsoft Power Virtual Agents.

Abstract
Nowadays, higher education institutions are facing an increasing demand for effective student and faculty support. This article focuses on the implementation of chatbots using Microsoft Power Virtual Agents (PVA) as a tool for helpdesk support in universities. The paper also addresses the process of selecting the optimal platform for creating a chatbot. Microsoft Power Virtual Agents proved to be one of the most suitable tools due to its flexibility and integration with existing systems.
Key Words: chatbot, helpdesk, automation, Microsoft Power Virtual Agents.

Úvod

Power Virtual Agents umožňuje tímom jednoducho vytvárať výkonné chatboty pomocou grafického rozhrania bez potreby kódu a bez potreby dátových vedcov alebo vývojárov.

Power Virtual Agents rieši mnohé z hlavných problémov pri tvorbe botov v súčasnom odvetví. Odstraňuje priepasť medzi odborníkmi na danú problematiku a vývojovými tímami, ktoré vytvárajú botov, takisto aj dlhé oneskorenie medzi tým, ako tímy rozpoznajú problém a aktualizujú bota, aby problém riešili. Odstraňuje zložitosť vystavovania tímov potrebu písania zložitého kódu. Takisto minimalizuje úsilie IT podpory na nasadenie a údržbu vlastného konverzačného riešenia.

Automatizácia a digitalizácia nie sú obmedzené len na biznis alebo technológiu, objavujú sa aj v akademickom svete, konkrétne na univerzitách. Tieto školy chcú poskytovať top vzdelanie, a to zahrňuje nielen dobré vyučovanie, ale aj organizáciu a komunikáciu medzi školou a študentami.

Univerzity musia denne riešiť množstvo zložitých otázok od študentov. Tieto otázky sa týkajú rôznych vecí, od predmetov až po termíny skúšok. Odpovede sa často nachádzajú po rôznych databázach, papieroch alebo len v hlavách určitých ľudí na administratíve. Preto by automatizácia týchto odpovedí mala byť nielen nasledujúcim logickým krokom, ale aj základnou potrebou.

V súčasnosti univerzity riešia tieto otázky v technickej podpore manuálne. No táto metóda je často neefektívna, zaberá veľa času a je drahá.

Cieľom tejto práce je vytvoriť chatbot, ktorý automatizoval proces zodpovedania týchto základných, ale dôležitých otázok. Ciel práce je: „Chatbot bude schopný znížiť počet ručne zodpovedaných otázok administrátorom“.

Návrhom databázy a definovaním API, ktoré budú slúžiť ako most medzi databázou a chatbotom. Následne budú tieto komponenty implementované a otestované.

1 Výber platformy

Porozumenie a uspokojenie používateľských záujmov sú kľúčové aspekty úspešného chatbota. Preto je výber správneho nástroja pre jeho vytvorenie tak dôležitý. Použitie vhodnej platformy nielenže uľahčuje vývoj, ale zároveň zabezpečuje, aby bola interakcia s botom intuitívna a efektívna.
Chatbot je navrhnutý s ohľadom na záujmy a potreby používateľov. To znamená, že dialógy sú prirodzené a odpovede chatbota užitočné a presné. Používateľské rozhranie zohráva kľúčovú úlohu, pretože je "tvárou" interakcie a je jednoduché, čisté a ľahko navigovateľné.

1.1 Princípy Fungovania Otázok a Odpovedí

Základom fungovania chatbota je mechanizmus otázok a odpovedí. Vytvorenie efektívneho systému otázka-odpoveď začína stavbou tematickej štruktúry, v ktorej každá otázka má jednu alebo viacero preddefinovaných odpovedí. Podľa výberu používateľa chatbot smeruje dialóg ďalej, poskytujúc informácie, ktoré sú najrelevantnejšie pre dopyt používateľa.
Príklad:
Otázka: „Aké sú termíny na podanie dokumentov na univerzitu?“
Odpovede:
„Termín na podanie dokumentov pre bakalárske štúdium končí 20. júla.“
„Termín na podanie dokumentov pre magisterské štúdium končí 15. augusta.“
Používateľ si vyberie: „magisterské štúdium“
Chatbot odpovie: „Termín na podanie dokumentov pre magisterské štúdium končí 15. augusta.“

Tento model umožňuje vytvárať komplexné dialógové scenáre, kde každý výber používateľa vedie k novému súboru otázok a odpovedí, robiac dialóg s chatbotom flexibilným a personalizovaným.

1.2 Výber Platformy pre Vytvorenie Chatbota

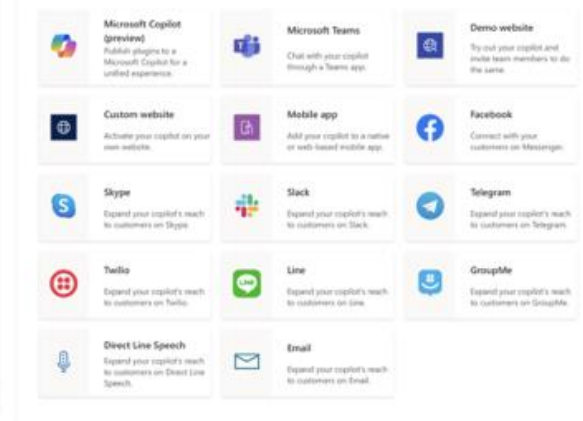
Výber platformy na vytvorenie chatbota s ohľadom nielen na technické možnosti, ale aj na pohodlie pre koncových používateľov

Platforma ponúka flexibilné nástroje pre stavbu dialógov, integráciu s inými službami a systémami, ako aj možnosti pre analýzu interakcií s používateľmi, aby sa neustále zdokonaľoval chatbot.

Napokon, dôležitosť výberu vhodného produktu pre vytvorenie chatbota nie je preceňovaná. Nie len že uľahčuje proces vývoja, ale tiež pomáha splniť a prekonať očakávania používateľov, robiac interakciu s chatbotom pohodlnou, užitočnou a príjemnou.

2 Vývoj Chatbotov

Proces vytvárania chatbotov v Power Virtual Agents (PVA) začína definovaním konverzačných scenárov. Užívatelia môžu vytvárať rôzne scenáre, ktoré reagujú na rôzne otázky a podnety užívateľa. Tieto scenáre môžu obsahovať otázky, možné odpovede, logické vetvenia a akcie, ktoré sa majú vykonať na základe odpovedí užívateľa.
Jednou z kľúčových funkcií PVA je jeho schopnosť integrovať sa s rôznymi systémami a službami.
Pri vytváraní chatbotov v PVA môžete využiť aj pokročilé technológie ako je umelá inteligencia(AI). S využitím AI môžete implementovať pokročilé funkcie ako rozpoznávanie reči, analýzu sentimentu alebo predikciu údajov priamo do vášho chatbota.
Okrem toho Power Virtual Agents poskytuje nástroje na testovanie a ladenie chatbotov. Užívatelia môžu simulovať konverzácie a overiť ich správnosť a účinnosť. Po úspešnom otestovaní je možné chatboty jednoducho nasadiť do rôznych kanálov komunikácie, ako sú webové stránky, aplikácie alebo platformy sociálnych médií.



Obr.1 Publikovanie a nasadzovanie

2.1 Skúsenosti s PVA

V priebehu môjho detailného štúdia o technológiách chatbota som prečítala rozsiahle množstvo literatúry, ktoré mi otvorilo dvere k rozmanitým prístupom vytvárania týchto asistentov. Zameriavala som sa najmä na platformy založené na databázach a aplikáciách programovacích rozhraní (API), kde som objavila, že hoci poskytujú určitú úroveň flexibility, často si vyžadujú intenzívnu údržbu a pravidelné aktualizácie.

V snahe prekonať tieto prekážky som iniciovala projekt s cieľom vyvinúť vlastnú databázu a integráciu API. Tento experiment však narazil na významné prekážky v dôsledku politiky Microsoftu, ktorý obmedzuje používanie výlučne svojich API, čím ma nútil hľadať alternatívne stratégie.

Moje pátranie po riešeniach ma priviedlo k možnosti využitia SharePointu ako potenciálneho nástroja pre správu obsahu chatbota. Predstavovalo to logický krok, vzhľadom na moju potrebu integrovať chatbota s existujúcimi systémami univerzity a zabezpečiť ľahký prístup k informáciám pre študentov. Napriek počiatočnému optimizmu som však čoskoro narazila na výzvy spojené s vysokými nákladmi a technickými obmedzeniami SharePointu, ktoré komplikovali jeho implementáciu v rámci môjho projektu.

Táto fáza experimentu mi poskytla cenné lekcie o obmedzeniach a možnostiach, ktoré nástroje ako SharePoint ponúkajú, a zdôraznila význam hľadania flexibilnejších a viac integrovateľných riešení. Nakoniec som svoju pozornosť sústredila na Microsoft Power Virtual Agents (PVA), platformu, ktorá sa ukázala ako ideálne riešenie pre moje požiadavky. S PVA som mohla priamo a efektívne vytvoriť a programovať potrebné otázky a odpovede, využívajúc pritom možnosti hlbšej integrácie s ostatnými systémami Microsoftu. Proces práce s PVA bol intenzívny a vyžadoval si detailnú analýzu a neustále zdokonaľovanie, no zároveň mi umožnil lepšie porozumieť potrebe adaptability a inovácie v rámci vývoja digitálnych asistentov.

Táto skúsenosť bola pre mňa mimoriadne obohacujúca, keďže som sa nielen naučila, ako efektívne vytvárať a vylepšovať chatboty s použitím PVA, ale zároveň som získala hlboké pochopenie o technických výzvach a stratégiách riešenia, ktoré sú neoddeliteľnou súčasťou procesu digitálnej inovácie na akademickom poli. Tento komplexný pohľad na vývoj chatbotov ma posunul bližšie k pochopeniu, ako digitálne technológie môžu efektívne slúžiť potrebám vzdelávacieho sektora, otvárajúc cestu pre ďalšie inovácie a zlepšenia v budúcnosti.

2.2 Vytvorenie témy

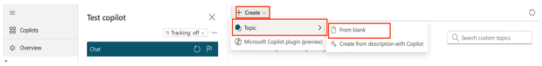
Samotné nastavenie chatbota vo vybranej platforme, ako je Power Virtual Agents (PVA), je prvým krokom pri jeho vytváraní. Po úspešnom konfigurovaní chatbota prechádzame k definovaniu tém, ktoré určujú hlavné oblasti konverzácie a funkcie chatbota.

Proces vytvárania tém v PVA začína definovaním konverzačných scenárov. Užívatelia majú možnosť vytvárať rôzne scenáre, ktoré reagujú na rôzne otázky a podnety užívateľa. Tieto scenáre môžu obsahovať otázky, možné odpovede, logické vetvenia a akcie, ktoré sa majú vykonať na základe odpovedí užívateľa.

Pri vytváraní tém je dôležité starostlivo definovať hlavné oblasti konverzácie a zabezpečiť, aby chatbot účinne reagoval na požiadavky používateľov. Následne je potrebné prejsť postupom vytvorenia témy, ktorý zahŕňa vyplnenie základných informácií o téme, ako je názov a opis, a definovanie zámerov a priebehu dialógu témy.

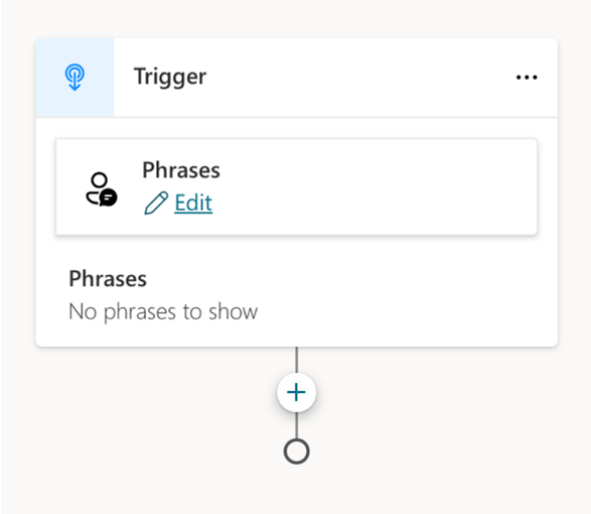
Po dokončení vytvárania tém je dôležité zabezpečiť ich uloženie, aby sa zmeny prejavili. Nakoniec je možné integrovať chatbota do rôznych digitálnych kanálov a platform, čím sa zabezpečí jeho dostupnosť a účinnosť v interakcii s používateľmi.

Ak chceme vytvoriť novú tému, musíme v ponuke chatbota nájsť príslušnú možnosť a kliknúť na tlačidlo „Nová téma“.



Obr.2 Postup 1

Keď klikneme na tlačidlo "Nová téma", otvorí sa formulár, kde budete požiadaní vyplniť základné informácie o téme, ako je názov a opis. Je dôležité, aby názov témy presne odrážal jej obsah, a opis pomáhal používateľom pochopiť, o čom bude táto téma.



Obr.3 Postup 2

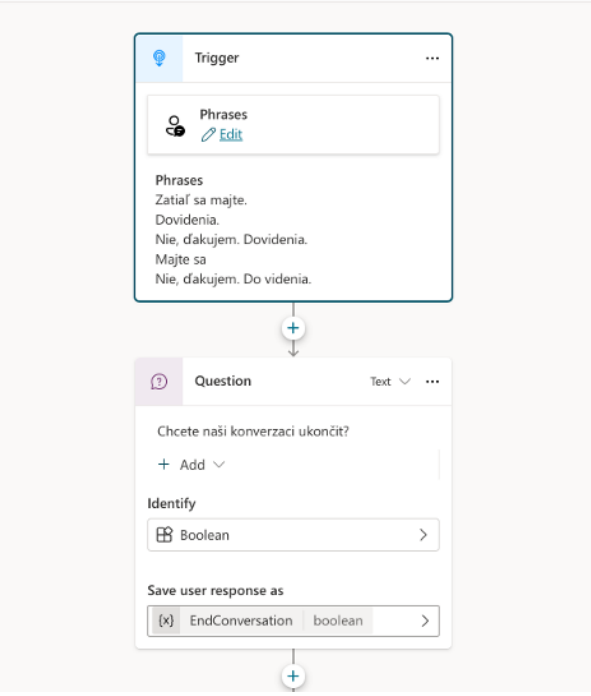
Pri návrhu zámerov a toku dialógu pre vašu tému budete musieť určiť a definovať typické otázky alebo požiadavky, ktoré používatelia môžu mať v rámci témy. Zámery slúžia na zachytenie týchto typických interakcií a umožňujú chatbotovi reagovať adekvátne.

Tok dialógu potom stanovuje postupnosť, v ktorej chatbot reaguje na požiadavky používateľov, vrátane možných vetvení a odpovedí na základe toho, ako používateľ reaguje alebo aké dodatočné informácie poskytne. Tento proces zahŕňa vytváranie logického a koherentného scenára, ktorý umožňuje plynulú a užitočnú interakciu medzi používateľom a systémom. Sú definované frázy aktivujúce ukončenie konverzácie. Trigger zahŕňa bežne používané slovné formulácie na rozlúčku, ako sú „Zatiaľ sa majte“, „Dovidenia“ a variácie s „Nie, ďakujem. Dovidenia.“

Pod týmito frázami je sekcia s názvom „Question“, kde je formulovaná otázka „Chcete našu konverzáciu ukončiť?“. Táto otázka slúži ako prostriedok pre chatbota na potvrdenie zámery používateľa ukončiť konverzáciu. Ďalšia časť "Identify" so zvolenou možnosťou "Boolean" naznačuje, že odpoveď na túto

otázku bude interpretovaná ako boolean hodnota (áno/nie).

Nakoniec, „Save user response as“ s premennou „endConversation“ zrejme slúži na uloženie odpovede používateľa, ktorá bude použitá na rozhodnutie o ukončení alebo pokračovaní v konverzácii. Táto časť ukazuje, že konfigurácia je zameraná na zachytenie a spracovanie používateľovej vôle ukončiť interakciu s chatbotom.[3]



Obr.4 Príklad workflow

2.3 Porovnanie PVA a ChatGPT

Porovnanie Power Virtual Agents (PVA) od Microsoftu a ChatGPT od OpenAI poukazuje na rozdiely v oblasti technológie na spracovanie prirodzeného jazyka (NLP), integrácii, rozšíriteľnosti, cenovej politike a celkovej dostupnosti. Tu je stručné zhrnutie hlavných rozdielov:

- Technologický rámec a NLP: ChatGPT využíva pokročilé algoritmy založené na modeli GPT-3, ktoré sú schopné vytvárať plynulý a kontextovo relevantný text, čo umožňuje simuláciu ľudskej komunikácie. PVA zase stavia na NLP schopnostiach Microsoft Azure, ktoré sú možno štruktúrovanejšie s dôrazom na vizuálne dizajnové prvky, vhodné aj pre užívateľov bez programátorských zručností.
- Integrácia a rozšíriteľnosť: ChatGPT môže byť integrovaný s rôznymi platformami prostredníctvom API, čo poskytuje vysokú úroveň flexibility. PVA je úzko prepojený s Microsoft ekosystémom, čo uľahčuje nasadenie a správu pre organizácie už používajúce produkty Microsoftu.
- Cena a dostupnosť: ChatGPT môže byť nákladnejší, najmä pri vyššom využívaní, ale na druhú stranu ponúka prístup k pokročilým funkcionalitám AI. PVA má predplatné, ktoré môže byť výhodnejšie pre organizácie ktoré majú Microsoft ekosystému.

Vo všeobecnosti, obidve platformy sú silné vo vytváraní chatbotov, ale ich využitie bude závisieť od špecifických potrieb a zdrojov danej organizácie. V kontexte vzdelávania, ak už je organizácia zanorená v Microsoft ekosystéme, PVA by mohlo byť preferované kvôli jednoduchosti integrácie. Pre organizácie hľadajúce viac pokročilé NLP možnosti alebo chcejúce experimentovať s inovatívnymi riešeniami, môže byť vhodnejší ChatGPT alebo iné alternatívy.[5]

2.4 Cenová ponuka

Cenová ponuka pre Power Virtual Agents sa pohybuje približne na sume $1,000 mesačne za nájomcu, čo zahŕňa 2,000 interakcií (z angl. sessions) s chatbotom. Cena za dodatočné interakcie je okolo $450 za ďalších 1,000 interakcií mesačne.

Cena sa určuje hlavne podľa nasledujúcich faktorov:

- Počet interakcií: Každá interakcia medzi užívateľom a chatbotom je počítaná ako jedna interakcia. V prípade, že potrebujete viac interakcií ako je zahrnutých v základnom balíčku, je potrebné dokúpiť dodatočné interakcie.
- Licenčný Model: Cena môže závisieť aj od toho, či už máte existujúce licencie Microsoft 365, ktoré môžu zahŕňať prístup k Power Virtual Agents. V takom prípade môžu byť náklady nižšie.
- Rozsah Použitia: Cena môže závisieť aj od rozsahu, ako plánujete chatbotov využívať – či už interne pre podporu zamestnancov, alebo externe pre zákaznícku podporu.[6]

2.5 Nevýhody využitia Power Virtual Agents

- **Limitovaná chápavosť**: PVA a podobné nástroje nemajú schopnosť úplne porozumieť ľudským konverzáciám a podtextom, tak ako to dokážu ľudia. Aj keď sú schopné zvládať základné dialógy, zložitejšie konverzačné spojenia im môžu unikať.
- **Obmedzenia v odpovediach**: Chatboty, vrátane tých, ktoré sú postavené na PVA,

môžu poskytovať odpovede, ktoré sú niekedy nesprávne alebo neúplné, zvlášť v situáciách, kde sú požiadavky používateľov neštandardné alebo nejasné.

- **Problémy s integráciou**: Integrácia chatbota s inými systémami a databázami môže byť náročná a vyžadovať si dodatočné zdroje na vývoj a údržbu, aby bolo zabezpečené hladké a efektívne fungovanie.
- **Bezpečnosť a ochrana súkromia**: Chatboty manipulujú s veľkým množstvom osobných údajov, čo prináša výzvy týkajúce sa ich ochrany. Je potrebné zabezpečiť, aby systémy boli navrhnuté s ohľadom na súčasné právne predpisy a normy pre ochranu údajov.
- **Zneužitie a omyly**: Chatboty môžu byť zneužité na poskytovanie mylných informácií alebo môžu byť cieľom útokov, ktoré majú za cieľ šíriť dezinformácie.
- **Závislosť na technológii**: Pri nadmernej závislosti na chatbotových riešeniach môže dochádzať k problémom, ak nastanú technické zlyhania alebo výpadky, čo môže spôsobiť prerušenie poskytovania služieb.

2.6 Umelá inteligencia v Power Virtual Agents

V posledných aktualizáciách Power Virtual Agents (PVA) od Microsoftu sme videli veľký posun v oblasti umelej inteligencie. Tieto zmeny robia interakcie s chatbotmi oveľa intuitívnejšími, citlivejšími a prispôsobujú sa individuálnym potrebám používateľov.

Jednou z hlavných inovácií je vylepšenie spracovania prirodzeného jazyka (NLP), čo zlepšuje schopnosť chatbotov porozumieť zámerom používateľa a umožňuje plynulejšie konverzácie. Vďaka tomu chatbot dokáže lepšie interpretovať rôzne formy otázok a odpovedí, čo vedie k zlepšeniu celkovej užívateľskej skúsenosti.

Taktiež boli zavedené algoritmy strojového učenia, čo umožňuje chatbotom učiť sa z interakcií s používateľmi a prispôsobovať sa ich potrebám v priebehu času. To znamená, že čím viac chatbot komunikuje s používateľmi, tým lepšie dokáže predvídať ich potreby a efektívne na ne reagovať.

Nové analytické nástroje teraz ponúkajú hlbší prehľad o výkonnosti chatbotov a angažovaní používateľov. Tieto údaje sú kľúčové pre neustále zdokonaľovanie chatbotov a zabezpečenie toho, aby spĺňali meniace sa očakávania používateľov. Celkovo tieto inovácie robia Power Virtual Agents významným nástrojom na vytváranie efektívnych a personalizovaných komunikačných kanálov, ktoré sú schopné poskytovať jedinečné skúsenosti zákazníkom.[7]

3 Budúcnosť a inovácie

V blízkej budúcnosti by mohol každý študent mať k dispozícii svojho osobného digitálneho asistenta v podobe chatbota. Títo virtuálni pomocníci, vďaka pokrokom v technológii umelej inteligencie, by mohli poskytovať okamžité odpovede na otázky, ponúkať prispôsobenú učebnú podporu a dokonca zjednodušovať administratívne procesy na vysokých školách. Predstavte si, že pri príprave na skúšky alebo písaní záverečnej práce máte neustále po ruke pomocníka, ktorý vie presne, čo potrebujete.

Chatboti v akademickom prostredí by mohli slúžiť ako most medzi študentmi a bohatstvom informácií, ktoré škola ponúka, ale ktoré sú často ťažko prístupné kvôli tomu lebo študenti nevedia, kde začať hľadať. Tieto programy by mohli automatizovať odpovede na bežné dotazy týkajúce sa termínov skúšok, registrácie predmetov alebo dokonca poskytovať usmernenia pre nových študentov.

Vzdelávanie by sa tak mohlo stať efektívnejším a viac prispôsobeným individuálnym potrebám študenta. Chatboti by mohli ponúknuť personalizované učebné plány alebo odporúčať zdroje na štúdium založené na predchádzajúcom výkone a preferenciách študenta. To by študentom umožnilo lepšie využiť svoj čas a zdroje a zefektívniť svoje študijné návyky.

Okrem toho, využitie chatbotov by mohlo pridať element zábavy do procesu učenia. Interaktívne kvízy, simulácie alebo dokonca virtuálne reality vytvorené chatbotmi by mohli učiť študentov nové koncepty spôsobom, ktorý je nielen informatívny, ale aj zábavný.

Zavádzanie chatbotov na vysokých školách by mohlo predstavovať značnú zmenu v tom, ako pristupujeme k vzdelávaniu. Zatiaľ čo sa objavujú otázky týkajúce sa súkromia, bezpečnosti a presnosti informácií poskytnutých týmito AI asistentmi, potenciál pre transformáciu akademického prostredia je obrovský. Úspech ich implementácie bude závisieť od toho, ako budú tieto výzvy riešené, a od ochoty akademickej komunity prijať a prispôsobiť sa týmto novým technológiám.

4 Výsledky a diskusia

Naša analýza ukázala, že implementácia chatbotov a PVA na vysokých školách má významný potenciál zlepšiť študentskú spokojnosť a efektivitu vzdelávacích procesov. Chatboti, ktorí sú dostupní 24/7, poskytujú

študentom okamžitý prístup k informáciám a podpore, čo výrazne znižuje čas čakania a administratívne zaťaženie personálu.

Jedným z hlavných pozitív, ktoré chatboti prinášajú, je zlepšená komunikácia medzi študentmi a univerzitou. Študenti ocenili možnosť získať rýchle odpovede na svoje otázky bez potreby osobnej návštevy kancelárií alebo čakania na odpovede e-mailom.

Ďalším významným zistením bolo, že chatboti môžu prispieť k personalizácii vzdelávacieho procesu. Vďaka analýze dát o študentoch a ich učebných preferenciách môžu chatboti navrhovať individuálne študijné materiály a zdroje, čím podporujú efektívnejšie učenie.

Avšak, s implementáciou chatbotov sú spojené aj určité výzvy. Jednou z hlavných je zabezpečenie presnosti a relevancie informácií poskytovaných chatbotmi. Náš výskum ukázal, že chatboti niekedy poskytovali zastarané alebo nepresné informácie, čo môže viesť k zmätku medzi študentmi.

Diskusia o výsledkoch naznačuje, že pre úspešnú implementáciu chatbotov je kritické neustále aktualizovať a učiť chatbotov s najnovšími informáciami. Tiež je dôležité zapojiť študentov a pedagogický personál do procesu vývoja a testovania chatbotov, aby sa zabezpečilo, že ich funkcie budú, čo najviac vyhovovať potrebám koncových používateľov.

Celkovo naše zistenia poukazujú na to, že chatboti a PVA majú potenciál transformovať vysokoškolské vzdelávanie, ale ich úspech bude závisieť od spôsobu, akým sú tieto technológie implementované a integrované do vzdelávacích procesov.

Záver

V tomto článku sme sa zaoberali potenciálom a výzvami implementácie chatbotov a platformy ako služby (PVA) vo vysokoškolskom vzdelávaní. Naše najdôležitejšie zistenia ukazujú, že chatboti môžu výrazne prispieť k efektívnejšej komunikácii medzi študentmi a univerzitou, personalizácii vzdelávacieho procesu a zlepšeniu dostupnosti vzdelávacích zdrojov.

Hlavné prínosy chatbotov zahŕňajú:

- Okamžitý prístup k informáciám: Chatboti poskytujú študentom rýchle a pohodlné odpovede na ich otázky, čím sa znižuje potreba osobného kontaktu a čas čakania na odpovede.

- Personalizácia vzdelávania: Možnosť prispôsobiť učebné materiály a zdroje individuálnym potrebám študentov podporuje efektívnejšie učenie a zvyšuje študentskú angažovanosť.

- Zníženie administratívnej záťaže: Automatizácia rutinných dotazov a požiadaviek študentov môže výrazne znížiť administratívnu záťaž pedagogického a administratívneho personálu.

Napriek týmto pozitívnym aspektom sme identifikovali aj výzvy, ako sú otázky presnosti a relevancie poskytovaných informácií a potreba neustáleho aktualizovania a vylepšovania systémov chatbotov, aby sa zabezpečila ich efektivita a užitočnosť.

Pre budúce využitie v praxi je kľúčové, aby univerzity a vzdelávacie inštitúcie prijali strategický prístup k implementácii a integrácii chatbotov do vzdelávacích procesov. To zahŕňa pravidelné hodnotenie a aktualizáciu chatbotov, zapojenie študentov a pedagógov do vývojového procesu a zabezpečenie, že technológie sú prispôsobené špecifickým potrebám a očakávaniam užívateľov.

V konečnom dôsledku môžu chatboti a PVA výrazne prispieť k inovácii a zlepšeniu vysokoškolského vzdelávania, avšak ich úspech bude závisieť od premyslenej implementácie, neustáleho zlepšovania a zapojenia komunity. Tento výskum otvára dvere pre ďalšie štúdie o tom, ako môžu tieto technológie najlepšie slúžiť vzdelávacím inštitúciám a ich študentom v budúcnosti.

Tento projekt, môže slúžiť ako príklad pre iné fakulty a školy, ktoré majú podobné problémy

Poďakovanie

Chcela by som vyjadriť svoju vďaku Vladimírovi Siládimu za jeho hodnotné rady, profesionálne vedenie a podporu, ktorú mi poskytoval počas môjho projektu. Jeho odborné znalosti a povzbudzovanie boli pre mňa neoceniteľné a významne prispeli k úspechu môjho projektu. Taktiež vďaka patrí firme Uakom, ktorej pomoc umožnila získanie potrebných prístupov a zdrojov potrebných na prácu. Bez vašej pomoci by som nedosiahla to, čo mám teraz.

Použitá literatúra

[1] Microsoft Copilot Studio documentation [online] Dostupne:https://learn.microsoft.com/en-us/microsoft-copilot-studio/

[2] Čo je chatbot a aké má využitie? [online]. Patrik Serbín,19.9.2019 Dostupne: https://www.podnikajte.sk/technologie/co-je-chatbot-vyuzitie

[3] DTX. (2024) dataxan [online].Dostupné: https://dataxan.com/insights/finance-tax-

transformation/chatbot/faq-chatbot-dialogflow-vs-power-virtual-agents-pva/
[4] Microsoft. „Planned Features“ Power Virtual Agents 2023 Release Wave 1. [online] Dostupné: https://learn.microsoft.com/en-us/power-platform/release-plan/2023wave1/power-virtual-agents/planned-features
[5] Open Data Science. „Создай своего ИИ-ассистента с помощью ChatGPT и Streamlit“ Habr. [online] Dostupné: https://habr.com/ru/companies/ods/articles/729662/
[6] Microsoft Power Users Community. "New PVA Pricing Promotion." Microsoft Power Users. Dostupné: https://powerusers.microsoft.com/t5/General/New-PVA-pricing-promotion/td-p/1529228
[7] Microsoft. (2024) Advanced ai features in microsoft copilot studio. [Online]. Dostupné: https://learn.microsoft.com/en-us/microsoft-copilot-studio/advanced-ai-features

Porovnanie algoritmov generujúcich dokonalé bludiská pre potreby 3D mobilnej videohry

Comparing algorithms that generate perfect mazes for 3D mobile video game needs

Juraj Uhrina[1] – Jana Jurinová[1]
Školiteľ: Jana Jurinová[1]
[1]Ústav počítačových technológií a informatiky, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Nám. J. Herdu 2, Trnava, 917 01
uhrina1@ucm.sk, jana.jurinova@ucm.sk

Abstrakt
Cieľom práce je poukázať na problematiku správneho výberu algoritmu pre procedurálne generovanie dokonalého bludiska pre potreby 3D mobilnej hry. Výber vhodného algoritmu je podmieňujúcim krokom v kontexte vývoja 3D mobilnej hry, ktorej vývoju sa venujeme. Okrem stručného predstavenia vybraných algoritmov, v príspevku taktiež porovnávame dané algoritmy z troch hľadísk. Prvým hľadiskom je samotná rýchlosť behu algoritmu, ktorá je v našom prípade kľúčovým aspektom, keďže príslušné bludiská generujeme v reálnom čase. Druhým aspektom sú pamäťové nároky daných algoritmov. Tento aspekt je dôležitý pretože obmedzený hardvér mobilného zariadenia môže mať problém s generovaním väčších bludísk. Napokon porovnávame algoritmy na základe štruktúry. Inými slovami, zisťujeme ako vyzerá bludisko generované príslušným algoritmom (t. j. koľko má slepých uličiek, rohov a pod.). Na základe týchto porovnaní, je možné vhodne zvoliť algoritmus podľa špecifických požiadaviek danej videohry.
Kľúčové slová: dokonalé bludisko, generovanie bludiska, porovnanie algoritmov, čas behu algoritmu, pamäťové nároky algoritmu.

Abstract
The aim of the work is to point out the issue of the correct choice of algorithm, procedurally generating perfect mazes for the needs of a 3D mobile game. Choosing a suitable algorithm is a conditioning step in the context of the development of a 3D mobile game, the development of which we are dedicated to. In addition to a brief presentation of the selected algorithms, in the paper we also compare the given algorithms from three points of view. The first aspect is the very speed of running the algorithm, which is a key aspect in our case, since we generate the relevant mazes in real time. The second aspect is the memory requirements of the given algorithms. This aspect is important because the limited hardware of the mobile device may have trouble generating larger mazes. Finally, we compare algorithms based on structure. In other words, we find out what the maze generated by the corresponding algorithm looks like (i.e. how many dead ends, corners, etc. it has). Based on these comparisons, it is possible to choose an appropriate algorithm according to the specific requirements of the given video game.
Key Words: perfect maze, maze generation, comparison of algorithms, execution time of algorithm, memory requirements of the algorithm

Úvod

Neustáli vývoj výkonu mobilných zariadení umožňuje herným vývojárom tvoriť čoraz sofistikovanejšie hry určené práve pre mobilné zariadenia. Výhodou mobilných zariadení v porovnaní s počítačmi, či hernými konzolami je najmä ich kompaktnosť a teda fakt, že ich máme neustále pri sebe. Mobilné hry teda v súčasnosti zažívajú rozmach a v blízkej budúcnosti tomu pravdepodobne nebude inak. Hoci výkon mobilných zariadení narastá z roka na rok, rovnako tak stúpajú aj nároky hráčov na samotné hry. Vývojári mobilných hier preto musia klásť dôraz na riešenie problémov súvisiacich s obmedzeným výpočtovým výkonom a rovnako s obmedzenými pamäťovými zdrojmi. Práve z tohto dôvodu sme sa pri vývoji 3D mobilnej hry generujúcej dokonalé bludiská zamerali na komparáciu algoritmov generujúcich takéto bludiská. Našim cieľom bolo vybrať algoritmus, ktorý by bol vhodný pre širokú škálu mobilných zariadení a zároveň by generoval bludiská, ktoré nie sú pre hráča triviálne. Z tohto dôvodu sme zisťovali aj akú štruktúru majú bludiská generované príslušnými algoritmami.

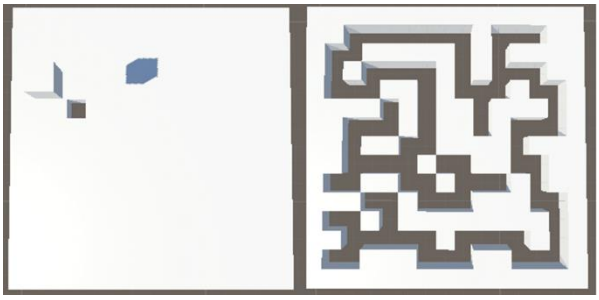
Taktiež nemôžme nespomenú, že príslušná mobilná hra bola vyvíjaná v hernom prostredí Unity.

1 Dokonalé bludisko a jeho reprezentácia

Pojmom dokonalé bludisko sú označované bludiská, ktoré spĺňajú dve podmienky:

1. Každá bunka bludiska môže byť dosiahnutá z inej bunky bludiska len jednou jedinečnou cestou.
2. Bunky bludiska sú reprezentované acyklickým neriadeným grafom [2].

Štruktúra bludiska zvykne byť reprezentovaná v 2D pomocou gridu, pričom bunka gridu reprezentuje vrchol v kontexte teórie grafov. Pre lepšiu predstavu reprezentujeme tieto vrcholy vo vývojovom prostredí Unity pomocou kociek. To znamená, že každý vrchol má alebo nemá kocku (respektíve je plný alebo prázdny). Bludisko teda vieme vytvoriť napríklad spôsobom, že na každú pozíciu gridu umiestnime kocku a následne odstraňujeme kocky tak, aby vznikli koridory, slepé uličky a podobne. Na obrázku 1 vidíme vľavo grid 15x15, kde každej bunke prislúcha kocka, pričom pre lepšiu vizualizáciu je jedna z kociek posunutá smerom hore na osi y (jedná sa o posun v prostredí Unity, ktoré využíva ľavotočivý súradnicový systém). Na pravej strane obrázku je rovnaký grid, avšak niektoré kocky boli odstránené tak, aby vzniklo práve dokonalé bludisko.



Obr. 1 Reprezentácia bludiska pomocou kociek na gride
Zdroj: [Autori]

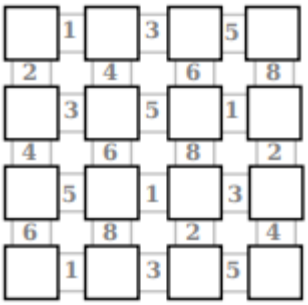
Odstraňovaním kociek nám teda vzniklo dokonalé bludisko, kde sú jednotlivé cesty reprezentované prázdnymi bunkami gridu a naopak steny plnými bunkami gridu, respektíve kockami.

2 Analýza vhodných algoritmov

Známe, a matematikmi detailne popísané algoritmy slúžiace na generovanie dokonalých bludísk využívajú 2D priestor. To znamená, že v našom prípade, respektíve pri vývoji 3D hry, bolo pri týchto algoritmoch nutné zvážiť možnosti implementácie týchto algoritmov v 3D priestore. Dané algoritmy sme ďalej študovali analýzou prác Mazes for programmers [1] a How to generate perfect mazes? [2], aby sme boli schopní vybrať rôznorodé algoritmy. Práve v druhej menovanej práci sa autori zameriavali na meranie zábavnosti riešenia bludiska vzhľadom na jeho zložitosť, čo je z nášho hľadiska podstatný faktor, keďže našim primárnym cieľom je vývoj mobilnej hry. *Primov algoritmus*, *Recursive Backtracker* a *Wilsonov algoritmus*, preukázali svoju účinnosť pri vytváraní zložitých a pútavých bludísk v dvojrozmerných priestoroch. Tieto tri algoritmy taktiež vynikajú svojimi odlišnými prístupmi k vytváraniu bludísk. *Primov algoritmus* je zameraný na metodickú expanziu z jednej bunky na ďalšiu, algoritmus *Recursive Backtracker* využíva hĺbkové vyhľadávanie (z angl. *depth-first search*), a *Willsonov algoritmus* sa sústreďuje na cyklickú náhodnú prechádzku. Tieto tri algoritmy sú zároveň vhodné pre naše potreby generovania v 3D priestore. Keďže pri *Primovom algoritme* je výsledné bludisko podmienené heuristickej funkcii, rozhodli sme sa prísť s vlastnou heuristikou, pričom našim cieľom bolo, aby algoritmus vytváral bludiská s menším počtom rovných prechodov a väčším počtom rohov, čím chceme vytvoriť rozmanitejšie bludisko. Implementovali sme teda dve verzie *Primovho algoritmu*. Posledným implementovaným algoritmom je kombinácia algoritmu *Kruskal* a *Primovho algoritmu*, pričom od tejto kombinácie očakávame väčšiu rozmanitosť vygenerovaných bludísk [1, 2].

2.1 Primov algoritmus

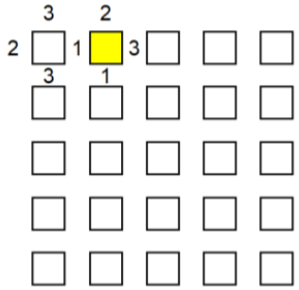
Primov algoritmus patrí medzi najpopulárnejšie algoritmy na tvorbu bludísk a to najmä vďaka jeho relatívnej jednoduchosti a pomerne kvalitným výsledkom. Tento algoritmus bol vynájdený českým matematikom Vojtechom Janíkom v roku 1930, avšak svoje pomenovanie získal po Robertovi Primovi, ktorý ho znovuobjavil v roku 1957. Výsledkom *Primovho algoritmu* je minimálna kostra stromu, čiže v našom prípade bludisko. *Primov algoritmus* funguje na základe ohodnotenia prechodov (ciest) medzi jednotlivými vrcholmi. To znamená, že prechod z jedného vrcholu na iný má vždy nejakú váhu (cenu). Takýto grid s ohodnotenými prechodmi medzi vrcholmi je reprezentovaný na obrázku 2 [1, 4, 7].



Obr. 2 Grid s ohodnotenými prechodmi
Zdroj: [1]

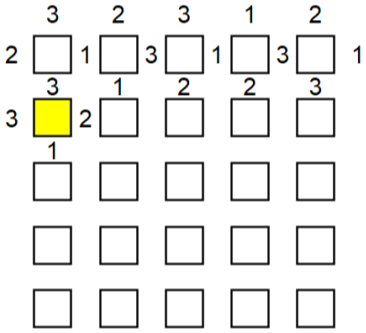
Prvým krokom algoritmu je výber počiatočného bodu. Ten je v našom prípade náhodný. Nasleduje výber prechodu s najmenším ohodnotením a následné prepojenie buniek, ktoré sú týmto prechodom spojené. Následne opäť vyberáme prechod s najmenším ohodnotením, avšak tentoraz už berieme do úvahy aj možné prechody z bunky, ktorú sme pripojili. Inými slovami, vždy zvažujeme prechody zo všetkých buniek, ktoré sme pripojili k existujúcej ceste, pričom za cestu považujeme jednotlivé prepojené bunky. V prípade ak máme viacero prechodov s rovnakým ohodnotením, ktoré je zároveň aj najmenšie, vyberieme prechod náhodne. Dôležitým pravidlom je tiež fakt, že nie je možné prepojiť dve bunky, ktoré už patria k ceste. Vznikol by totiž cyklus a už by sa nejednalo o dokonalé bludisko. Proces pripájania buniek na základe ohodnotenia sa opakuje, až pokým nepripojíme všetky bunky k existujúcej ceste. V našom prípade však neexistuje predom definované ohodnotenie prechodov medzi jednotlivými bunkami. Pre použitie *Primovho algoritmu* sme preto museli prísť s vlastnou heuristikou, na základe ktorej vykonáme takéto ohodnotenie. Heuristiky slúžiace na takéto ohodnotenie, respektíve tvorbu bludiska sa spravidla pochopiteľne líšia na základe individuálnych požiadaviek danej hry. V našom prípade sme sa rozhodli inšpirovať prácou "How to generate perfect mazes?" [2], podľa ktorých je dôležité pre tvorbu bludiska, ktoré bude zábavné na riešenie tvoriť toto bludisko tak, aby nemalo veľa koridorov a príliš dlhé koridory. Snažili sme sa preto prísť s heuristikou, ktorá by znevýhodňovala práve tvorbu koridorov [4, 7].

Logika našej heuristiky spočíva v tom, že prechádzame po riadkoch všetky bunky a ohodnocujeme prechody danej bunky, ktoré ešte ohodnotené nie sú. Na ohodnotenie používame číslice 1, 2, 3. Prvá hodnotená bunka je špecifická v tom, že ešte žiaden z jej prechodov nie je ohodnotení. Tu preto číslice 1, 2, 3 náhodne priradíme jednotlivým prechodom, pričom zvyšnému prechodu je náhodne pridelené ohodnotenie z rovnakého intervalu číslic 1, 2, 3. Keďže sa jedná o hraničnú bunku, ohodnotenie západnej a severnej strany bunky je zbytočné, no tu ho pre lepšiu vizualizáciu uvádzame. Následne sa presunieme na ďalšiu bunku v riadku. Tá už má jeden prechod ohodnotený číslicou 1. Práve na základe tohto ohodnotenie hodnotíme východný prechod danej bunky. Keďže chceme minimalizovať množstvo dlhých koridorov, oproti prechodu s ohodnotením 1 dávame ohodnotenie 3. Ohodnotenie severného prechodu je opäť zanedbateľné, keďže tu už nie je ďalšia bunka. Na ohodnotenie južnej bunky vyberáme náhodné z číslic 1 a 2. Číslicu 3 v tomto prípade vynechávame, pretože sme ju už pri ohodnocovaní tejto bunky použili. Ohodnotenie prechodov druhej bunky v poradí teda môže vyzerať tak, ako ilustruje obrázok 3.



Obr. 3 Ohodnocovanie prechodov príslušnej bunky
Zdroj: [Autori]

Proces opakujeme pre všetky bunky v riadku. Prvá bunka v ďalšom riadku už má ohodnotený prechod na severnej strane číslom 3 a preto jej južná strana dostáva číslicu 1. Pri hodnotení prechodu na východnej strane vyberáme z číslic 2 a 3. Výsledok teda môže vyzerať nasledovne:

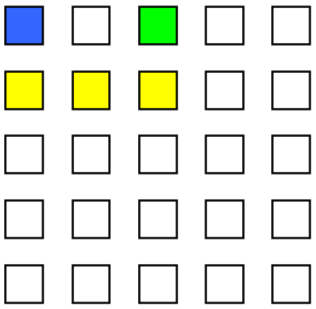


Obr. 4 Stav ohodnotenia príslušných prechodov
Zdroj: [Autori]

Ďalšia bunka v riadku má ohodnotené už dva prechody. Keďže prechod na severnej strane má hodnotenie 1, prechodu na južnej strane priradíme číslicu 3. Vzhľadom k tomu, že prechod na západnej strane disponuje hodnotením 2, ohodnotenie na východnej strane je vykonané náhodným výberom z číslic 1 a 3. Takýmto spôsobom pokračujeme až kým nie sú ohodnotené všetky relevantné prechody. Následne si náhodne zvolíme počiatočnú bunku a ďalej pripájame bunky podľa ohodnotenia jednotlivých prechodov. Tu je nutné podotknúť, že pri našej reprezentácii, kedy takpovediac odstránené kocky tvoria koridory a naopak plné kocky tvoria steny bludiska, nie je možné, aby boli všetky bunky pripojené k existujúcej ceste. V praxi to znamená, že v našom prípade nie je možné pripojiť bunku, ktorá má už viac ako jedného suseda patriaceho k danej ceste. Inak by totiž vznikol cyklus. Musíme teda zvoliť iný prechod, hoci je ohodnotenie daného prechodu vyššie. Týmto pravidlom sa riadime pri všetkých nami implementovaných algoritmoch. *Primov algoritmus* je modifikovateľný, v dôsledku čoho vznikol aj takzvaný zjednodušený, alebo tiež nazývaný *náhodný Primov algoritmus*. Ide o prípad, kedy všetky prechody majú rovnaké ohodnotenie. Na začiatku je teda vybraná jedna štartovacia bunka a následne náhodne vyberáme z dostupných prechodov (pričom dodržiavame pravidlo, že nemôžeme spojiť dve bunky, ktoré už patria ceste, respektíve v našom prípade pripojiť k ceste bunku, ktorá má viac ako jedného suseda patriaceho k ceste) až kým nevyčerpáme všetky možnosti. Rozhodli sme sa implementovať aj túto verziu *Primovho algoritmu*.

2.2 Willsonov algoritmus

Ďalším algoritmom na ktorý sme sa zamerali je *Willsonov algortimus*. Ten bol predstavený profesorom matematiky Davidom Willsonom. Základom tohto algoritmu je náhodné prechádzanie po bunkách. Takáto náhodná prechádzka vyzerá tak, že je zvolená jedna náhodná bunka, následne je k nej pridaná iná susedná bunka a tak dookola. Takáto náhodná prechádzka je ukončená v prípade ak táto náhodná prechádzka natrafí na bunku, ktorá už patrí k existujúcej ceste daného bludiska a je následne pripojená. V prípade ak pri náhodnej prechádzke vznikne cyklus, alebo sa dostane na hraničnú bunku bludiska, je táto prechádzka považovaná za neplatnú a teda jednotlivé bunky sú vrátené späť do stavu, v akom boli pred začatím tejto náhodnej prechádzky. Na začiatku je preto potrebné vybrať si náhodne jednu bunku, ktorá je automaticky priradená k ceste daného bludiska. Následne sa začne náhodná prechádzka. Na obrázku 5 je prvá zvolená bunka (respektíve existujúca cesta) reprezentovaná modrou farbou. Začiatok náhodnej prechádzky je reprezentovaný zelenou farbou a zvyšné bunky, ktoré boli navštívené náhodnou prechádzkou sme označili žltou farbou [1].



Obr. 5 Náhodná prechádzka pri *Willsonovom algoritme*
Zdroj: [Autori]

Ako môžeme vidieť, pri náhodnej prechádzke sme natrafili na existujúcu cestu a tak je možné bunky navštívené náhodnou prechádzkou pridať k ceste. Takéto náhodné prechádzky sa opakujú až pokiaľ nie sú k ceste pridané všetky bunky, okrem tých, ktoré pridané byť nemôžu, pretože by inak vznikol cyklus. Pri tomto algoritme je možné predpokladať dlhší čas výpočtu, keďže obzvlášť pri bludiskách s väčšími rozmermi môže v počiatočných fázach vznikať problém nájsť existujúcu cestu náhodnými prechádzkami. S pribúdajúcimi bunkami patriacimi k ceste sa pravdepodobnosť výskytu tohto problému pochopiteľne znižuje.

2.3 Recursive Backtracker algoritmus

Vytváranie bludiska pomocou algoritmu *Recursive Backtracker* nápadne pripomína proces samotného riešenia bludiska a hoci je jeho vysvetlenie pomerne stručné, môže byť o niečo náročnejšie si predstaviť, ako presne algoritmus funguje. Základom tohto algoritmu je opäť náhodná prechádzka. Logika spočíva v tom, že k ceste pridávame vždy náhodného suseda bunky, na ktorej sa práve nachádzame, až pokým tento proces nie je možné vykonať. Vtedy sa vrátime späť na predchádzajúcu bunku a proces opakujeme. Čiže, akonáhle algoritmus natrafí na slepú uličku, vráti sa späť na predchádzajúcu bunku, odkiaľ môže ďalej objavovať, respektíve budovať bludisko. Na začiatku je teda náhodne zvolená jedna bunka, z ktorej algoritmus začína. Následne sa vyberie náhodne jeden zo susedov a ten je pridaný k ceste. Za aktuálnu bunku považujeme

práve novo pridanú bunku. Z jej susedov opäť náhodne vyberieme jednu bunku a tú pridáme k ceste, pričom ju prehlásime za aktuálnu bunku. V prípade ak žiaden zo susedov aktuálnej bunky nemôže byť pridaný k ceste, za aktuálnu bunku prehlásime predchádzajúcu bunku a pokračujeme s procesom pridávania náhodných susedov. Rovnako, ako v prípade predchádzajúcich algoritmov, sused aktuálnej bunky nemôže byť pridaný v prípade, ak už má viac ako jedného suseda patriaceho k ceste, pretože pridaním by vznikol cyklus a teda by sa už nejednalo o dokonalé bludisko, alebo je táto bunka hraničnou bunkou a teda by odstránením príslušnej kocky prišlo k odstráneniu hranice bludiska. Koniec algoritmu nastáva, keď sa algoritmus vráti späť na bunku, z ktorej začal a nie je možné ďalej pokračovať. Tento algoritmus môže mať vyššie pamäťové nároky, keďže si pamätá poradie buniek [6].

2.4 Kombinácia algoritmu *Kruskal* a *náhodného Primovho algoritmu*

Posledná implementácia na ktorú sme sa zamerali je kombináciou *Kruskalovho algoritmu* a *náhodného Primovho algoritmu*, ktorý sme už predstavili. Tieto dva algoritmy sú si veľmi podobné. Pri oboch pridávame k bludisku susedné bunky tých buniek, ktoré už patria k ceste. Rozdiel spočíva v tom, že pri *algoritme Kruskal* môže vzniknúť viacero nezávislých ciest. *Algoritmus Kruskal* totiž spája bunky na základe ohodnotenia. To znamená, že sa vždy snaží prioritne spojiť bunky, ktoré majú medzi sebou prechod s najnižším ohodnotením. Tým vznikajú viaceré cesty, ktoré sa neskôr spoja. V našom ponímaní sme sa rozhodli spojiť túto ideu s *náhodným Primovim algoritmom*, teda sme dané prechody neohodnocovali. Vytvárame teda viaceré cesty, ktoré sa rozširujú ako pri *náhodnom Primovom algoritme* a tie sa rozširovaným stretnú s inými cestami. Tieto cesty následne spojíme, v prípade ak to neporuší zásady dokonalého bludiska. Algoritmus končí po tom, ako sa všetky cesty spoja do jednej a tá sa už nemôže rozširovať, teda žiaden zo susedov už nemôže byť pridaný k danej ceste [3, 5].

3 Porovnanie algoritmov

Keďže príslušné algoritmy v našej hre používame v reálnom čase, kľúčovým parametrom je práve rýchlosť algoritmu, respektíve čas potrebný na vykonanie konečného počtu krokov daného algoritmu. Jednotlivé algoritmy sme spustili 200 krát, pričom rozmery bludiska boli 40x40. To znamená, že príslušné algoritmy vytvárali bludiská obsahujúce 1600 buniek, respektíve vrcholov v kontexte teórie grafov. Je nutné podotknúť, že dané merania boli vykonané na rovnakom zariadení, avšak nejednalo sa o mobilný telefón. To v tomto prípade nebolo nutné, pretože cieľom nebolo získať presný čas vykonania algoritmu na danom zariadení, ale získať prehľad o tom, aké sú rozdiely medzi časom vykonania príslušných algoritmov. V tabuľke 1 sú uvedené priemerné časy vykonania daných algoritmov v milisekundách.

Tabuľka 1 Porovnanie algoritmov z časového hľadiska
Zdroj: [Autori]

Algoritmus	Priemerný čas potrebný na vykonanie
Náhodný Primov algoritmus	1.0405395
Primov algoritmus s ohodnotením	379.827548
Willsonov algoritmus	3923.460416
Recursive Backtracker	0.3925975
Kombinácia Kruskal a Prim	6.8679865

Podľa očakávaní najhoršie v tomto teste dopadol *Willsonov algoritmus*. Hlavným negatívom tohto algoritmu je fakt, že v počiatočnej fáze algoritmu, kedy len minimum buniek patrí k ceste daného bludiska, je šanca, že náhodnou prechádzkou natrafíme na túto cestu pomerne nízka. Je preto nutné podotknúť, že čím väčšie bludisko chceme generovať, tým je z časového hľadiska využitie *Willsonovho algoritmu* menej vhodné. V tomto konkrétnom teste je dokonca rozdiel medzi najhorším – teda *Willsonovým algoritmom* a najlepším – teda algoritmom *Recursive Backtracker* takmer 10 000 násobný. Algoritmy *Recursive Backtracker* a *náhodný Primov algoritmus* môžeme podľa tohto testu považovať za extrémne rýchle, pričom kombinácia algoritmov *Kruskal a Primov algoritmus* dosiahol taktiež veľmi dobrý výsledok. Pri týchto troch algoritmoch je teda možné konštatovať, že sú dostatočne rýchle. O niečo horší výsledok dosiahol *Primov algoritmus s heuristikou*, čo je pochopiteľné, keďže v tomto prípade na rozdiel od *náhodného Primovho algoritmu*, je nutné najskôr ohodnotiť cesty medzi jednotlivými vrcholmi grafu a následne pri samotnom výbere bunky, ktorá bude pripojená k ceste nestačí náhodne vybrať, ale je nutné porovnávať jednotlivé ohodnotenia. *Primov algoritmus s ohodnoteným* teda v tomto teste vyšiel približne 365 krát horšie ako *náhodný Primov algoritmus*. Môžeme

teda konštatovať, že pri použití tohto algoritmu je nutné brať do úvahy veľkosť bludiska a počítať prípadne s dlhším časom výpočtu.
Následne sme vykonali test pamäťových nárokov. V programovacom jazyku *C#* sme použili metódu *System.GC.GetTotalMemory()*, ktorá poskytuje približné množstvo bajtov aktuálne alokovaných v riadenej pamäti. Túto metódu sme teda použili pred a po spustení príslušného algoritmu, pričom nás zaujímal rozdiel daných hodnôt. Rovnako ako v predchádzajúcom meraní, aj tu sme využili rozmery bludiska 40x40. V tabuľke 2 sú uvedené priemerné hodnoty naalokovanej pamäte pre príslušné algoritmy v bajtoch.

Tabuľka 2 Porovnanie algoritmov z pamäťového hľadiska
Zdroj: [Autori]

Algoritmus	Naalokovaná pamäť
Náhodný Primov algoritmus	53653
Primov algoritmus s ohodnotením	64931
Willsonov algoritmus	1209600
Recursive Backtracker	42598
Kombinácia Kruskal a Prim	88991

Rovnako, ako v predchádzajúcom teste, aj tu si *Willsonov algoritmus* v porovnaní s ostatnými algoritmami počínal veľmi zle. Rovnako, najlepší výsledok zaznamenal algoritmus *Recursive Backtracker* a hneď za ním sa opäť umiestnil *náhodný Primov algoritmus*. Opäť je pochopiteľné, že *Primov algoritmus s ohodnotením* dosiahol horší výsledok ako *náhodný Primov algoritmus*. Na rozdiel od predchádzajúceho testu, v tomto teste už však nebol rozdiel taký značný. Hoci kombinácia algoritmu *Kruskal a Primov algoritmus* o niečo zaostáva oproti lepším algoritmom z tohto testu, rozdiel nie je obzvlášť dramatický.

Cieľom posledného testu bolo zistiť štruktúru bludísk, ktoré jednotlivé algoritmy generujú. Každá bunka môže byť na základe svojich susedov zatriedená do jednej z nasledujúcich kategórií: rovina, križovatka, T križovatka, roh, slepá ulička. Tieto kategórie sa dajú ešte bližšie špecifikovať. Napríklad roviny vieme rozdeliť na horizontálne a vertikálne, avšak takéto detailné rozdelenie v tomto prípade nie je potrebné, keďže by nám neposkytlo lepší prehľad o štruktúre daného bludiska. Snažíme sa totiž zistiť rozmanitosť štruktúr jednotlivých bludísk a nie jeho presný obraz. Pri tomto teste bol počet iterácií a veľkosť bludísk zhodný s predchádzajúcimi testami. V tabuľke 3 môžeme vidieť koľko rovín, križovatiek, T križovatiek, rohov a slepých uličiek majú v priemere dané bludiská. Vzhľadom na veľkosť tabuľky sme v nej zaviedli skratky:

- Prim – *Náhodný Primov algoritmus*
- HP – *Primov algoritmus s ohodnotením*
- Will – *Willsonov algoritmus*
- RB – *Recursive Backtracker*
- KP – *Kombinácia Kruskal a Prim*
- Rov – Udáva počet rovín
- Križ – Udáva počet križovatiek
- T – Udáva počet križovatiek v tvare T
- Roh – Udáva počet rohov
- Slep – Udáva počet slepých uličiek
- SUM – Udáva celkový počet buniek, ktoré nie sú stenami

Tabuľka 3 Porovnanie algoritmov z hľadiska štruktúry
Zdroj: [Autori]

	Rov	Križ	T	Roh	Slepá	SUM
Prim	215.8	32.4	203.6	192.5	270.3	914.6
HP	154.2	15.9	170.4	230.9	201.4	772.7
Will	278.4	1.7	96.3	290.4	101.7	768.4
RB	265.5	1.9	102.8	343.9	108.7	823.0
KP	208.7	31.0	194.7	183.3	258.7	876.5

Pri pohľade na štruktúru *náhodného Primovho alhoritmu* a *Primovho algoritmu s ohodnotením* môžeme vidieť, že *Primov algoritmus s ohodnotením* vytvára menej rovín a viac rohov, čo bolo aj cieľom danej heuristiky. Treba však podotknúť, že *Primov algoritmus s heuristikou* má celkovo menej buniek, ktoré nie sú stenami (ďalšou kategóriou by mohli byť steny, všetky zvyšné bunky bludiska sú stenami), čo znamená, že toto bludisko je menšie. Z hľadiska veľkosti sa *Willsonov algoritmus* opäť ukazuje ako

najhorší a taktiež vytvára aj najviac rovín, čo nemusí byť práve želateľné, keďže následkom je znížená náročnosť riešenia bludiska. *Willsonov algoritmus* nevytvára takmer žiadne križovatky, no v porovnaní s ostatnými algoritmami vytvára pomerne veľa rohov. V počte rohov ho predbieha iba algoritmus *Recursive Backtracker* v ktorom rohy dominujú, no má aj pomerne veľké množstvo rovín. Štruktúra bludísk vytvorených *Willsonovým algoritmom* a algoritmom *Recursive Backtracker* je podobná, avšak s tým rozdielom, že bludiská vytvorené algoritmom *Recursive Backtracker* majú menej stien a teda sú väčšie. Rovnako tak sú si podobné výsledky *náhodného Primovho algoritmu* a kombinácie *algoritmu Kruskal a Prim.*

Na namerané hodnoty je nutné prihliadať s potrebným nadhľadom, respektíve treba ich chápať v kontexte špecifických požiadaviek danej hry. Hoci *Willsonov algoritmus* obstál v testoch najhoršie, môže byť vhodný na generovanie malých bludísk, ktoré budú jednoduché na riešenie. Algoritmus *Recursive Backtracker* sa ukázal ako najviac efektívny no nemusí byť vhodný v prípade, ak nechceme, aby výsledné bludisko obsahovalo príliš veľa rohov. Čo sa týka *Primovho algoritmu*, ten je závislý na ohodnotení, respektíve heuristickej funkcii. V našom prípade heuristika síce splnila požiadavky na štruktúru bludiska, avšak daný algoritmus nepatril k najefektívnejším z časového hľadiska a potrebnej pamäte. Pri výbere je preto potrebné zvážiť konkrétne požiadavky na dané bludisko, ako aj hardvérové možnosti príslušných zariadení, na ktorých budú dané bludiská generované.

Záver

Hoci algoritmy generujúce dokonalé bludiská boli navrhnuté na tvorbu bludísk v 2D priestore, v práci ukazujeme, že je možné niektoré z týchto algoritmov použiť aj v 3D priestore. V práci sme stručne popísali tri takéto algoritmy, pričom každý z nich funguje špecifickým spôsobom. Následne sme prišli s vlastnou heuristikou, ktorú aplikujeme na *Primov algoritmus*, aby sme ovplyvnili výslednú štruktúru bludiska. Využili sme tiež kombináciu dvoch algoritmov – *Kruskal a Prim* pre generovanie rozmanitejších bludísk. Týchto päť algoritmov sme následne porovnávali z troch hľadísk - časová náročnosť, pamäťové nároky a samotná štruktúra bludiska. Na základe dát získaných vykonanými meraniami uvádzame výhody a nevýhody príslušných algoritmov, respektíve vysvetľujeme aké sú medzi nimi rozdiely a kedy je vhodné ich využiť. Na základe týchto dát je teda možné vytvoriť si obraz o štruktúre bludísk generovaných príslušnými algoritmami, ako aj o ich vhodnom využití na základe špecifických požiadaviek v kontexte časovej náročnosti a pamäťových nárokov. Môžeme tiež konštatovať, že heuristika aplikovaná na *Primov algoritmus* a taktiež kombinácia *algoritmov Kruskal a Prim* priniesli požadované výsledky.

Použitá literatúra

[1] BUCK, Jamis. 2015. Mazes for programmers. Dallas : The Pragmatic Programmers, LLC, 286 s. ISBN 9781680500554.

[2] BELLOT, Victor a kol. 2021. How to generate perfect mazes?. In Elsevier Inc. in Information Sciences, vol. 572, no. 1, pp. 444-459. ISSN 0020-0255.

[3] GeeksForGeeks: Kruskal's Minimum Spanning Tree (MST) Algorithm. [online]. GeeksForGeeks: 2023 [cit. 23.1.2024]. Dostupné z: https://www.geeksforgeeks.org/kruskals-minimum-spanning-tree-algorithm-greedy-algo-2/

[4] KOLADE, Chris: Prim's Algorithm – Explained with a Pseudocode Example [online]. freeCodeCamp: 2023 [cit. 7.1.2024]. Dostupné z: https://www.freecodecamp.org/news/prims-algorithm-explained-with-pseudocode/

[5] HYBESIS, Hurna: Maze generations: Algorithms and Visualizations. [online]. Medium: 2019 [cit. 15.2.2024]. Dostupné z: https://medium.com/analytics-vidhya/maze-generations-algorithms-and-visualizations-9f5e88a3ae37

[6] ABED-ESFAHANI, Aryan: Maze Generation — Recursive Backtracking. [online]. Medium: 2021 [cit. 12.11.2023]. Dostupné z: https://aryanab.medium.com/maze-generation-recursive-backtracking-5981bc5cc766

[7] GeeksForGeeks: Prim's Algorithm for Minimum Spanning Tree (MST). [online]. GeeksForGeeks: 2024 [cit. 4.3.2024]. Dostupné z: https://www.geeksforgeeks.org/prims-minimum-spanning-tree-mst-greedy-algo-5/

Implementácia mobilného robota v prostredí ROS

Mobile robot implementation in ROS environment

Filip Vojník[1] – Michal Vagač[1]
Školiteľ: Michal Vagač[1]
[1]Katedra informatiky, FPV UMB, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica,
filip.vojnik@student.umb.sk, michal.vagac@umb.sk

Abstrakt
Middleware Robot Operating System (ROS) sa stal štandardom pre softvérové riadenie robotov. Používa sa na množstve profesionálnych priemyselných robotoch, ako aj tých jednoduchých, skonštruovaných v malých tímoch výskumníkov. Integrácia svojpomocne skonštruovaného robota v middleware ROS nemusí byť triviálna a priamočiara - je potrebné splniť množstvo podmienok. Práve toto bolo cieľom tejto práce, v ktorej opisujeme postup a výsledky pri integrácii nášho robota do ROS middleware.
V prvej časti článku sa venujeme stručnému predstaveniu ROS middleware a požiadavkam pre integráciu mobilného robota do tohto systému. V druhej časti opisujeme konštrukciu nášho robota a implementáciu uzlov pre ROS. V závere zhrnieme dosiahnuté výsledky.
Kľúčové slová: mobilný robot, diferenciálny podvozok, ROS

Abstract
Robot Operating System (ROS) middleware has become the standard for robot programming. It is used in wide range of robots – from professional industrial robots to the simpler ones, developed by small research teams. Integration of such self-developed robot in ROS middleware can be not easy – it is required to fulfil a range of different conditions. The aim of this work is to describe the work and results of integrating of our robot in the ROS middleware.
In the first part of this document we briefly introduce ROS middleware and requirements for mobile robot integration. Then we introduce construction of our robot and ROS nodes implementation. Results are described in the final section.
Key Words: mobile robot, differential drive, ROS

Úvod

Robotika v čoraz väčšej miere zasahuje do rôznych oblastí bežného života. Už dávno nie je len témou sci-fi príbehov a dlhšie nie je ani výhradne témou výroby vo veľkých fabrikách. Vďaka širokej dostupnosti rôznych nástrojov a knižníc je možné venovať sa jej na vysokej úrovni aj v skromnejších podmienkach.

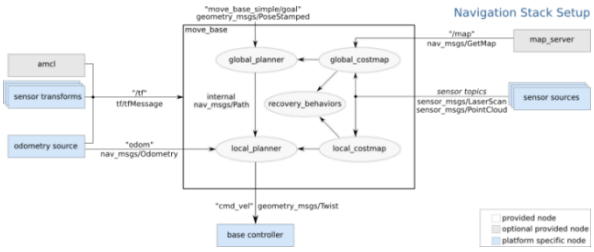
Jedným z najrozšírenejších prostredí pre vývoj softvéru na ovládanie robota je middleware ROS [1]. Ako veľa iných startupov vznikol ako výsledok práce študentov doktorandského štúdia na Standford University v roku 2007 [2]. Založili firmu Willow Garage a ich cieľom bolo vytvoriť spoločný pracovný rámec pre softvérových vývojárov tak, aby nemuseli riešiť nízkoúrovňové hardvérové rozdiely jednotlivých robotov. Počas 17 rokov vývoja je podporovaný stále väčším počtom výrobcov a stáva sa štandardom pre programovanie robotov.

Cieľom tejto práce je integrovať nami skonštruovaný mobilný robot v prostredí ROS. Takáto integrácia umožní nasledovne využívať množstvo algoritmov v tomto prostredí – a to napr. na mapovanie okolia alebo navigáciu.

1 Požiadavky na robot z pohľadu ROS middleware

Architektúru ROS middleware predstavuje skupina programov, ktoré medzi sebou komunikujú zasielaním správ. Toto je možné opísať grafom, v ktorom uzly predstavujú vykonávané programy a hrany medzi nimi sú tvorené komunikačnými kanálmi (tzv. topics).

Celá konštrukcia (a konfigurácia) robota následne sleduje tento princíp – napr. uzol ovládania motorov reaguje na správy s požiadavkou na nastavenie rýchlosti, uzol sledovania otáčok kolies rozposiela správy s aktuálnou rýchlosťou, uzol ovládania lidaru rozposiela správy o umiestnení prekážok v okolí a uzol mapovania prijíma správy o umiestnení prekážok a tvorí mapu.



Obr. 1 Konfigurácia navigácie mobilného robota Zdroj: [3]

Na Obr. 1 je znázornená základná konfigurácia uzlov potrebná pre navigáciu robota. Bielou farbou sú znázornené hotové a pripravené uzly. Šedou farbou sú nepovinné uzly. Modrou farbou sú uzly ktorých implementácia úzko súvisí s použitou hardvérovou platformou. Práve tieto uzly sú predmetom tejto práce. Keďže používame vlastnú konštrukciu robota, musíme tieto uzly naprogramovať.

Jedna sa o nasledovné uzly:

- *Base controller.* Uzol, ktorého úlohou je ovládať motory poháňajúce kolesá robota. Reaguje na správy typu Twist, v ktorých sú definované požadované rýchlosti (uhlová a lineárna).
- *Odometry source / sensor transforms.* Výpočet a propagovanie odometrie a transformácií medzi jednotlivými súradnicovými sústavami.
- *Sensor sources.* Uzly s ďalšími pripojenými senzormi (typicky Lidar alebo 3D kamera).

2 Konštrukcia robota

Základ konštrukcie robota tvorí model Dagu Wild Thumper 4WD [4], ktorý je zapožičaný z katedry informatiky FPV UMB (Obr. 2). Konštrukcia obsahuje štyri jednosmerné motory s enkodérmi a prevodovkou 34:1 pripojenou na kolesá s priemerom 120mm. Telo robota je dierované pre upevnenie jednotlivých komponentov.



Obr. 2 Dagu Wild Thumper 4WD

2.1 Pohon kolies

Keďže spomenutá konštrukcia obsahuje všetko potrebné pre zabezpečenie pohybu robota (motory a kolesá), bolo potrebné vymyslieť spôsob ovládania motorov. Existuje viacero spôsobov ovládania motorov – my sme použili Polulu Dual VNH5019 driver. Tento driver obsahuje 2 ovládacie kanály, ktoré budú potrebné na samostatné ovládanie motorov na ľavej aj pravej strane. Tým sa zabezpečí zatáčanie/otáčanie robota. Výhodou 2 kanálov je aj to, že stačí použiť iba jeden driver, ktorý bude ovládať obe nápravy samostatne (pri 1 kanálovom by bolo potrebné zakúpiť 2 drivre). Taktiež tento driver dokáže na 1 kanál ponúknuť výstup až 12A (každý motor na našom podvozku potrebuje 6.6A pre správne fungovanie). My budeme na každý kanál pripájať 2 motory. Driver je určený pre Arduino takže logika ovládania motorov sa bude vykonávať pomocou Arduino MEGA.

2.2 Zapojenie a ovládanie motorov

Ako prvý krok bolo potrebné zapojiť jednotlivé motory do Polulu drivera. Ľavú stranu sme pripojili na 1. kanál a pravú stranu paralelne na druhý kanál. Driver motorov je napájaný z 3 článkovej Li-Po batérie s výstupným napätím 11.1V.

Následne bolo potrebné zabezpečiť komunikáciu Arduina s ovládačom motorov. Pre komunikáciu Arduina s ovládačom sme použili knižnicu DualVNH5019MotorShield, pomocou ktorej bolo možné ovládať rýchlosť motorov a to hodnotou v škále od -400 do 400 (podľa smeru).

Keďže v našom robote budeme chcieť ovládať rýchlosti motorov v m/s, zvolili sme pre ovládanie PID reguláciu, kde vstup bude tvoriť práve rýchlosť v m/s. Avšak pre reguláciu rýchlosti bolo potrebné implementovať spätnú väzbu, ktorá bude poskytovať aktuálnu rýchlosť motorov. Túto hodnotu získame z enkóderov motorov, ktoré sme zapojili na interrupt piny Arduina. Použitie interrupt pinov zabezpečí okamžitú reakciu na každý signál z enkódera. Spomenuté enkódery na motoroch nám poslúžia ako spätná väzba pre PID regulátor. Z každej nápravy nám stačilo zapojiť 1 motor do interrupt pinu na Arduine, aby sme vedeli sledovať rýchlosti otáčania kolies. V našom prípade sme zvolili spôsob, pri ktorom cez interrupt piny snímame počet impulzov z enkóderu motora, následne v loop funkcií Arduino každú pol sekundu prepočítava impulzy na rýchlosť v m/s.
K tomuto prepočtu musíme najprv prepočítať impulzy (nazbierané každých 500ms) na otáčky:

$$rps_L = \frac{(impulseCounter_L \cdot 2)}{pulsesPerRevolution}$$

$$rps_R = \frac{(impulseCounter_R \cdot 2)}{pulsesPerRevolution}$$

potom vypočítať uhlovú rýchlosť v Rad/s:

$$\omega_L = 2 \cdot \pi \cdot rps_L$$
$$\omega_R = 2 \cdot \pi \cdot rps_R$$

a ako posledný krok dostaneme rýchlosť v m/s (r = 0.06 m je polomer kolesa):

$$v_L = r \cdot \omega_L$$
$$v_R = r \cdot \omega_R$$

Pre jednoduchšiu implementáciu PID regulátora sme použili Arduino knižnicu PID_v1. Následne bolo potrebné nakalibrovať PID regulátor tak, aby sa robot vedel plynule rozbehnúť a udržiavať požadovanú rýchlosť.

3 Ovládanie robota prostredníctvom ROS middleware

Keďže jadro logiky ovládania celého robota bude zabezpečované cez ROS, bolo potrebné prepojiť Arduino s ROS. ROS oficiálne podporuje komunikáciu s Arduinom cez seriálový port a komunikácia je zabezpečená cez knižnicu ros.h v Arduine, ktorú bolo potrebné stiahnuť do prostredia Arduino IDE.

Prvý krokom komunikácie bolo potrebné zabezpečiť odosielanie požiadaviek o rýchlosti cez ROS do Arduina. Ako prvú, jednoduchšiu implementáciu sme zvolili komunikáciu pomocou správ typu std_msgs, pri ktorej sa rýchlosť (v m/s) posiela ako hodnota typu float. Arduino bude v systéme ROS predstavovať uzol, ktorý bude prijímať správy s požadovanou rýchlosťou. Po prijatí správy s požadovanou rýchlosťou sa daná hodnota nastaví do PID regulátora. Táto implementácia bola najjednoduchšia forma komunikácie ROS s Arduinom a slúžila na vyskúšanie prepojenia a komunikácie.

Druhá implementácia komunikácie používala správy typu Twist [5]. Twist správa obsahuje lineárnu a angulárnu (uhlovú) rýchlosť a je veľmi často používaná pre zadávanie rýchlosti v mobilných robotoch. Keďže v tomto type správ odosielame uhlové rýchlosti (kde sa každá náprava môže ísť rôznou rýchlosťou) a naše Arduino momentálne obsahovalo iba 1 PID regulátor pre všetky motory, bolo potrebné vytvoriť 2 samostatné PID regulátory pre pravú a ľavú stranu kolies (pri zatáčaní sa budú nápravy otáčať rozdielnymi rýchlosťami).

Ďalším krokom bolo prepočítanie lineárnej a uhlovej rýchlosti na 2 samostatné rýchlosti pre ľavú a pravú nápravu. Tento prepočet je závislý od vzájomnej vzdialenosti kolies.

$$right = \frac{(v_{angular} \cdot WHEELS_d)}{2} + v_{linear}$$
$$left = v_{linear} \cdot 2 - right$$

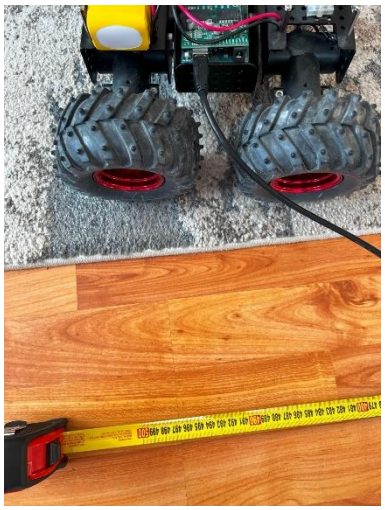
Kde *left* a *right* predstavujú nastavenia pre PID regulátory pre ľavé a pravé kolesá. Vypočíta sa na základe požadovanej lineárnej a angulárnej rýchlosti a vzdialenosti kolies od seba.

4 Výsledky a diskusia

Pre overenie správnosti našej implementácie sme navrhli nasledovný test: Prostredníctvom ROS middleware pošleme robotu Twist správu s takou konfiguráciou rýchlostí, ktoré budeme vedieť fyzicky skontrolovať (t.j. že robot prejde práve takú dráhu, ako požadujeme).

Pre test sme zvolili rovnú dráhu o dĺžke 5 metrov, kde vyskúšame presnosť robota s rýchlosťou 0.5 m/s a 1 m/s. S odoslanou správou do ROSu začneme stopovať čas, následne robota stopneme po 10 sekundách (pre rýchlosť 0.5 m/s)a 5-tich sekundách (pre 1 m/s). V oboch prípadoch by mal prejsť dráhu 5 m.

Na obr. 3 a 4 vidno miesto, kde robot zastal pri zvolenej konfigurácii rýchlosti a času.



Obr. 3 Výsledok pri rýchlosti 0,5 m/s počas 10 s



Obr. 4 Výsledok pri rýchlosti 1 m/s počas 5 s

S výsledkom sme boli veľmi spokojný. Robot sa dokáže pohybovať celkom presne, avšak nedokáže sa pohybovať s úplnou 100% presnosťou. Čo nie je pri robotoch nič neobvyklé, tieto nedostatky sa budú odstraňovať v plánovanom postupe. Do výsledkov musíme rátať aj to, že v danom čase je zahrnutý aj rozbeh robota a následné regulovanie rýchlosti, ktoré má na starosti nami nastavený PID regulátor.

Záver

V článku sme predstavili požiadavky pre integrovanie mobilného robota do ROS middleware. Na základe vlastnej konštrukcie je potrebné implementovať ovládanie motorov, odometriu a prácu so senzormi. V tomto článku sme sa zamerali na prvý krok - ovládanie motorov. Podľa teoretických východísk sme vytvorili implementáciu, ktorú sme overili na dvoch scenároch.

V ďalšom kroku bude potrebné implementovať spätnú väzbu o pohybe robota (takže okrem zasielania správ z ROS-u do Arduina budeme zasielať správy aj opačným smerom – z Arduina do ROS-u). Pre správne fungovanie komunikácie je potrebné publikovať správy o tom, kam sa robot posunul. Keďže robot sa nebude hýbať so 100% presnosťou hlavne počas rozbiehania a zatáčania, bude potrebné informovať ROS o tom, kam sa robot pohol. Slúžia na to správy typu Odometry, kde sa ROS dozvie o reálnej rýchlosti robota a taktiež o pozícií a polohe robota (správy Pose a Twist). Pomocou Odometry správ bude možné sledovať pomocou programu ROS RVIZ (visualizér) reálnu pozíciu jednotlivých častí robota vo svete.

Keďže momentálne jedinou informáciou o pozícii robota pre ROS sú len údaje z enkóderov motorov a robot sa bude musieť v reálnom svete vedieť vyhýbať prekážkam, bude veľmi potrebnou súčasťou robota LIDAR senzor, ktorý bude snímať okolie robota. V tomto prípade bude ROS vedieť vyhodnotiť lepšie reálnu pozíciu robota a snímať jednotlivé prekážky pre naplánovanie novej trasy. V tejto situácií by mal ROS vedieť ovládať motory, vedieť presnú polohu robota a sledovať jeho okolie. Poslednou časťou pre zabezpečenie autonómnosti bude potrebné implementovať algoritmy na mapovanie a výpočet trasy k zadanému cieľu na základe prekážok v reálnom svete.

Použitá literatúra

[1] ROS – Robot Operating System [online]. [cit. 6.3.2024]. Dostupné z: https://ros.org/

[2] Robot Operating System [online]. Wikipedia [cit. 6.3.2024]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Robot_Operating_System

[3] Setup and Configuration of the Navigation Stack on a Robot [online]. [cit. 6.3.2024]. Dostupné z: https://wiki.ros.org/navigation/Tutorials/RobotSetup

[4] Dagu Wild Thumper 4WD All-Terrain Chassis [online]. [cit. 6.3.2024]. Dostupné z: https://www.pololu.com/product/1564

[5] geometry_msgs/Twist Message [online]. [cit. 6.3.2024]. Dostupné z: https://docs.ros.org/en/noetic/api/geometry_msgs/html/msg/Twist.html

Súvisiace práce

Corke, P. (2023). Robotics, Vision and Control. Brisbane, QLD, Australia: Springer.

Roland Siegwart, I. R. (2004). Autonomous Mobile Robots. London, England.

FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED UNIVERZITY MATEJA BELA

UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED A INFORMATIKY

Sekcia

PhD. I. (biológia)

Súčasné princípy biofortifikácie pšenice zinkom

Current principles of wheat biofortification with zinc

Alexandra Hlavatá[1] – Richard Hančinský[1]
Školiteľ: Ildikó Matušíková[1,2]
[1]Fakulta prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave. Nám. J. Herdu 2 917 01 Trnava,
[2]Ústav biológie a biotechnológie (ÚBB),Oddelenie biológie
[1,2]ildiko.matusikova@ucm.sk, [1]hlavata3@ucm.sk, [1]richard.hancinsky@ucm.sk

Abstrakt
Zinok ako esenciálny ťažký kov je kľúčovým prvkom ľudskej stravy a zdravotným stavom populácie. Podvýživa z dôsledku nedostatku zinku predstavuje celosvetový problém, pričom najvýraznejší je najmä v rozvojových krajinách, kde je konzumácia často obmedzená na potraviny s nízkou hladinou zinku. Nízke hladiny mikroživín v rastlinách súvisia s ich klesajúcou koncentráciou v pôde alebo ich nízkou biologickou dostupnosťou a abiotickým stresom, ktoré narúšajú správny rast a vývin rastlín. Odborná verejnosť sa začala intenzívne zaujímať o riešenie týchto problémov v poľnohospodárstve v rámci otázky potravinovej bezpečnosti. Možným riešením s preukázateľne pozitívnymi výsledkami je agronomická biofortifikácia pšenice. Agronomická biofortifikácia zahŕňa inovatívne postupy aplikácie zinku pre zvýšenie jeho obsahu v jedlých častiach rastliny, čo pomáha v riešení skrytého hladu v populácií.
Kľúčové slová: biofortifikácia, zinok, pšenica, hnojivá, nanohnojivá.

Abstract
Zinc as essential heavy metal is a key element in human diet and health. Malnutrition due to zinc deficiency is a worldwide problem. The problem is mainly in developing countries, where consumption is limited to foods with low levels of zinc. Low levels of micronutrients in plants are related to their decreasing concentration in the soil or low bioavailability and the presence of abiotic stresses that disturb the proper growth and development of plants. The professional public has become intensely interested in solving these problems in agriculture. A possible solution with positive demonstrable results is the agronomic biofortification of wheat. Agronomic biofortification includes innovative methods of applying zinc to the plant, especially in the edible parts of the plant, which helps in solving hidden hunger in populations.
Key Words: biofortification, zinc, wheat, fertilizers, nanofertilizers

Úvod

Pšenica (*Triticum aestivum L.*) je členom čeľade *Poaceae,* a najrozšírenejšou plodinou na planéte. Vďaka svojim adaptívnym atribútom na rôzne klimatické a environmentálne stresy pšenica výrazne prispieva k prekonávaniu prekážok potravinovej bezpečnosti. V krajinách ako India, Pakistan, Bangladéš a Nepál, pšenica predstavuje 70% denného príjmu kalórií vo vidieckom obyvateľstve. Biofortifikácia je jedným zo spôsobov, ako zvýšiť hladinu mikroživín v plodinách. Existujú tri hlavné prístupy k biofortifikácii: agronomické, konvenčné šľachtenie rastlín a šľachtenie rastlín pomocou genetického inžinierstva. Agronomická biofortifikácia predstavuje metódu začleňovania mikroživín do hnojív, ktoré následne môžu byť aplikované na rastliny ako listové postreky alebo priamo do pôdy. Pre zlepšenie výsledku sa môžu aplikovať hnojivá aj prostredníctvom zmiešanej aplikácie, teda do pôdy aj na listy súčasne [1]. Agronomická biofortifikácia predstavuje najjednoduchšiu a najdostupnejšiu metódu biofortifikácie, čo ju robí zaujímavou aj pre menších farmárov. Pre zlepšenie účinnosti sa používajú na aplikáciu biohnojivá alebo nanohnojivá [2]. Aplikácia nanočastíc minimalizuje škodlivý vplyv chemikálii na životné prostredie a zabezpečuje kotrolovaný proces uvoľnovania agrochemikálií do prostredia. Úspech agronomickej biofortifikácie na zmiernenie nedostatku Zn závisí od niekoľkých faktorov. Medzi tieto faktory patria: pôdne podmienky (ako napríklad dostupnosť Zn v pôdnom roztoku, pH pôdy, prevzdušnovanie pôdy), dávka hnojiva, podmienky prostredia a čas aplikácie [3]. Príjem, distribúcia a alokácia zinku predstavujú súbor komplexných procesov ktorých pochopenie je kľúčové pre úspešnú a efektívnu biofortifikáciu [4]. Zlepšenie biologickej dostupnosti Zn možno zabezpečiť voľbou vhodnej stratégie obhospodárenia pôdy, použitím

organických hnojív, alebo ovplyvnením bio-geochemického kolobehu živín prostredníctvom selekcie pôdnej mikroflóry [1, 5].

1 Príjem zinku rastlín

Nedostatok zinku pre rastlinu znamená zníženie hladiny rastlinných hormónov, fotosyntetických enzýmov, ovplyvňovanie delenia buniek a zvýšenie stresu rastliny [6]. Príjem zinku koreňmi je prvým krokom v pohybe Zn z pôdy do obilia. Zinok musí prekonať aspoň tri apoplastické bariéry aby sa dostal z pôdy do koreňov a bol ďalej transportovaný cez pletivá rastliny až do semena. Vďaka rozloženiu membránového potenciálu je jeho prechod cez bunkové kompartmenty energeticky náročný a vyžaduje aktívne transportéry [7]. Vstup Zn do cytoplazmy uľahčujú najmä členovia rodiny proteínov ZIP pomenované podľa sekvencie homologickej s zinc-regulated transporter (ZRT) a iron-regulated transporter (IRT) (ZRT/IRT) [7]. ZIP transportéry majú hlavnú úlohu v transporte Zn a homeostáze kovov v rastlinách. Okrem Zn^{2+} sa ZIP transportéry údajne podieľajú na preprave ďalších katiónov prechodných kovov, ako napríklad mangán (Mn^{2+}), železo (Fe^{2+}), kadmium (Cd^{2+}), kobalt (Co^{2+}), meď (Cu^{2+}) a nikel (Ni^{2+}) [8]. Nachádzajú sa v rôznych bunkových organelách a pomáhajú rastline aj s adaptáciou na nízke alebo vysoké hladiny Zn. Transport mierne alkalickou floémovou šťavou však vyžaduje väzbu Zn na nejaký intracelulárny ligand a transportéry plazmatickej membrány z rodiny *YSL*-yellow stripes like [8, 9]. O konštrukčných vlastnostiach ZIP transportérov toho veľa nevieme, avšak poznáme ich význam pri transporte a homeostáze Zn.

Najvýznamnejším krokom z hľadiska biofortifikácie je akumulácia živín v zrnách. Za tento transport sú zodpovedné gény *MHA, ZIP, Nramp, NAS a YSL* [10].Fe a Zn sa nachádzajú v aleurónovej a embryonálnej vrstve zrna. Dôležité sú aj promotórové látky, ktorých zvýšenie obsahu sa považuje za žiadúce, a antinutrienty, ktoré naopak je potrebné znížiť. Medzi promotórové látky patrí napríklad vitamín E, vitamín D, cholín, niacín a provitamín A [11, 12]. Medzi antinutrienty sa radia fytáty, polyfenoly a oxalát. Genotypy s nízkym obsahom fytátu sú žiadaným a sľubným východiskom pre šľachtenie pšenice z hľadiska biofortifikácie Zn [12].

2 Agronomická biofortifikácia

Súčasná agronomická biofortifikácia predstavuje najjednoduchší a zároveň účinný proces zvyšovania kvality poľnohospodárskych plodín z nutričného hľadiska [13]. Agronomické princípy biofortifikácie zahŕňajú aplikáciu hnojív alebo zlepšenie mobilizácie prvkov priamo v pôdach [14]. Nevýhodou však môže byť ekonomická náročnosť použitia špecifických hnojív, ktoré sú v procese biofortifikácie využívané. Zvýšením nákladov pri pestovaní sa zvyšuje cena výsledného produktu, čo môže ovplyvniť výsledný dopyt a teda aj konzumáciu týchto potravín v rozvojových krajinách [15].

2.1 Agronomická biofortifikácia prostredníctvom listovej aplikácie

Listová aplikácia živín, najmä mikroživín v neskorších štádiách plodín, má význam pri zvyšovaní výnosov plodín a zvyšovaní efektívnosti využitia živín [16]. Aplikácia pomocou listového postreku umožňuje transport živín priamo do miest s vysokou metabolickou potrebou (zrná), čo sú konzumovateľné časti rastliny [17]. Listová aplikácia je vhodná najmä pri nepriaznivých pôdnych faktoroch [18]. Kedže pri listovej aplikácií nedochádza ku kontaktu s pôdou, nedochádza ani k fixácii Zn v pôde. Dôležité pri listovej aplikácií je najmä načasovanie postreku, pričom je najvhodnejšie zvoliť postrek až v neskoršom štádiu rastu [19].Pri listovej aplikácií bolo pozorované aj zlepšenie kvality zrna pšenice. Listovo aplikovaný Zn zlepšil rast plodín, čo v konečnom dôsledku zvýšilo výnos, pretože má schopnosť regulovať stomatálne otvory, zlepšuje fotosyntetickú účinnosť, zvyšuje tvorbu chlorofylu a tiež zvyšuje listovú plochu rastliny [20].

2.2 Agronomická biofortifikácia prostredníctvom aplikácie do pôdy

Aplikácia do pôdy zabezpečuje dostatočnú úroveň živín na absorpciu koreňmi [21] Aplikácia mikroživín ako hnojív môže zlepšiť stav mikroživín v pôde, ako aj napraviť ich nedostatok v rastlinách [22, 21]. Napriek tomu sa v mnohých prípadoch mikroživiny aplikované na pôdu okamžite fixujú a nie sú ľahko translokované do konzumovateľných častí rastlín, čo je jedna z hlavných nevýhod tejto aplikácie [23]. Aplikácia do pôdy býva často kombinovaná spolu s aplikáciou na listy, keďže táto kombinácia je efektívnejšia a lepšia na zvýšenie produkcie zŕn v porovnaní so samotnou aplikáciou pôdy alebo listov. Aplikácia do pôdy má nižšiu nákladovú efektívnosť oproti listovej aplikácií a časom znečisťuje pôdu v dôsledku nadmerného hromadenia nevyužitých mikroživín [24].

3 Primovanie osiva

Na zlepšenie obsahu živín v obilninách je jednou zo stratégií použitie primovaniu osiva [25]. Primovanie semien sa primárne používa na zlepšenie klíčivosti, rozvoju koreňového systému, zakladaniu sadeníc a zlepšeniu výnosov [26]. Primovanie osiva je technika, pri ktorej sa semená namočia do živného roztoku s ideálnym pomerom makro a mikro elementov, namiesto čistej vody, aby sa zvýšil obsah živín v semenách spolu s prízemným účinkom na zlepšenie klíčivosti. Základný náter semien Zn zvyšuje obsah Zn v semenách obilnín a pomáha aj skoršej klíčivosti aj v stresových podmienkach rastlín [27]. Vzhľadom na rozdielnu morfológiu semien a druhov rastlín, využívajú sa rôzne techniky primovania (hydropriming, osmopriming, hormonal priming) [28]. V primovaní osiva je taktiež sľubným prístupom využívanie nanočastíc. Nanočastice prechádzajú do obilnín cez trhliny na povrchu listov, prieduchy aj koreňové vlásky [29, 30]. Ich transport a alokácia a distribúcia závisí od typu rastliny, veľkosti častíc, povrchového náboja aj času expozície [29, 30, 31].

Primovanie osiva má aj svoje limity. Napríklad v semenách kukurice základný náter Zn nebol rovnomerne akumulovaný a distribuovaný v pletivách [32]. Predpokladá sa, že pletivá semien kukurice majú premenlivú schopnosť viazať alebo držať exogénne aplikovaný Zn [32]. Aj preto je potrebný ďalší výskum v tejto oblasti, a je potrebné objasniť fyzikálno-chemické vlastnosti primovania osiva zinkom a väzbovú kapacitu rôznych pletív poľnohospodárskych komodít.

Záver

Napriek tomu že sa agronomická biofortifikácia javí ako sľubná a efektívna metóda na zvýšenie mikroživín v obilninách, má táto metóda isté svoje limity a negatíva. Vo výskume týkajúcom sa akumulácie Fe a Zn v zrnách pretrvávajú medzery. Je potrebné objasnenie epistatických interakcií v akumulácií Zn, je potrebné využívanie moderných genetických techník pri tak komplexnom procese akým je biofortifikácia. Genetická úprava prenosom génov je pre hexaploidný genóm pšenice stále veľkou výzvou. Moderné metódy ako clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR associated protein (CRISPR/Cas) pre vystrihnutie neželaných sekvencií sa javia ako čoraz sľubnejšie. Z hľadiska nutričných potrieb najmä v rozvojových krajinách je agronomická biofortifikácie pšenice významná. Na zabezpečenie obohacovania plodín mikroživinami a boj proti skrytému hladu by agronomická biofortifikácia mala byť kľúčovou oblasťou budúceho zamerania a ďalšieho výskumu.

Poďakovanie

Príspevok bol podporený Agentúrou na výskum a vývoj v rámci grantu č. APVV-21-0504.

Použitá literatúra

[1] OUMER A., et al. 2022. Zinc agronomic biofortification of staple crops may be a cost-effective strategy to alleviate zinc deficiency in Ethiopia, Frontiers in Nutrition, VOLUME 9, Dostupné z: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.1037161 10.3389/fnut.2022.1037161, ISSN=2296-861X

[2] SZEREMENT, J., et Al. 2022. Agronomic Biofortification with Se, Zn, and Fe: An Effective Strategy to Enhance Crop Nutritional Quality and Stress Defense—A Review. J Soil Sci Plant Nutr 22, 1129–1159. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s42729-021-00719-2

[3] SINGH, S., et al. 2023. Agronomic bio-fortification of wheat (Triticum aestivum L.) to alleviate zinc deficiency in human being. Re/views in environmental science and bio/technology, 22(2), 505–526. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11157-023-09653-4

[4] BOTOMAN L., et al. 2022. Agronomic biofortification increases grain zinc concentration of maize grown under contrasting soil types in Malawi. Plant direct, 6(11), e458. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/pld3.458

[5] COSTA, et al. 2023. Agronomic Biofortification and Yield of Beet Fertilization with Zinc. Agronomy, 13, 1491. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/agronomy13061491

[6] HAMZAH M, et al. 2022. Functions and strategies for enhancing zinc availability in plants for sustainable agriculture. Front. Plant Sci. 13:1033092. doi: 10.3389/fpls.2022.1033092

[7] LIU D. et al. 2019. Zinc Uptake, Translocation, and Remobilization in Winter Wheat as Affected by Soil Application of Zn Fertilizer. Frontiers in plant science, 10, 426. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00426

[8] AJEESH TP, et al. 2020. Structure, Function, Regulation and Phylogenetic Relationship of ZIP Family Transporters of Plants. Front. Plant Sci. 11:662. doi: 10.3389/fpls.2020.00662

[9] DINANT S., Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding,Comptes Rendus Biologies,Volume 333, Issues 6–7,2010,Pages 504-515,ISSN 1631-0691,

Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.03.008.
[10] ISLAM, M. A., et al. 2020. TaYS1A, a Yellow Stripe-Like Transporter Gene, Is Required for Wheat Resistance to Puccinia striiformis f. sp. Tritici. Genes, 11(12), 1452. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/genes11121452
[11] SAMTIYA, M., et al. 2020. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. Food Prod Process and Nutr 2, 6 Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s43014-020-0020-5
[12] KAMBLE, U., et al. 2022. Ensuring Nutritional Security in India through Wheat Biofortification: A Review. Genes, 13(12), 2298. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/genes13122298
[13] COSTA, R.M.C., et al. 2023. Agronomic Biofortification and Yield of Beet Fertilization with Zinc. Agronomy 13, 1491. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/agronomy13061491
[14] PRAHARAJ, S., et al. 2021. Zinc Biofortification in Food Crops Could Alleviate the Zinc Malnutrition in Human Health. Molecules (Basel, Switzerland), 26(12), 3509. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/molecules26123509
[15] STANGOULIS, J.C.R., et al. 2022. Biofortification of major crop plants with iron and zinc - achievements and future directions. Plant Soil 474, 57–76 , Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11104-022-05330-7
[16] SATTAR A, et al. 2022. Foliar application of zinc improves morpho-physiological and antioxidant defense mechanisms, and agronomic grain biofortification of wheat (Triticum aestivum L.) under water stress. Saudi J Biol Sci. Mar;29(3):1699-1706. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.10.061. Epub 2021 Oct 29. PMID: 35280547; PMCID: PMC8913544.
[17] SANCHEZ, J. T., et al. 2023. Formulation of zinc foliar sprays for wheat grain biofortification: a review of current applications and future perspectives. Frontiers in plant science, 14, 1247600. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1247600
[18] SINGH S, et al. 2023. Agronomic bio-fortification of wheat (Triticum aestivum L.) to alleviate zinc deficiency in human being. Rev Environ Sci Biotechnol. 2023;22(2):505-526. doi: 10.1007/s11157-023-09653-4. Epub Apr 27. PMID: 37234132; PMCID: PMC10134721.
[19] OFORI, K. F., et al. 2022. Improving nutrition through biofortification-A systematic review. Frontiers in nutrition, 9, 1043655. Dostupné z: https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1043655
[20] SOMANATH Nayak, et al. Soil and foliar application of Zn enhances its biofortification, bioavailability and productivity in both biofortified and non-biofortified wheat varieties,Journal of Food Composition and Analysis, Volume 124,2023,105691,ISSN 0889-1575, Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105691.
[21] CHAUDHARY M., et al. 2022. Agronomic Biofortification of Food Crops: A Sustainable Way to Boost Nutritional Security. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.103750
[22] SINGH S., et al. 2023. Agronomic bio-fortification of wheat (Triticum aestivum L.) to alleviate zinc deficiency in human being. Re/views in environmental science and bio/technology, 22(2), 505–526. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11157-023-09653-4
[23] ZHAO AQ, et. Al. 2014. Comparison of soil and foliar zinc application for enhancing grain zinc content of wheat when grown on potentially zinc-deficient calcareous soils. J Sci Food Agric. Aug;94(10):2016-22. doi: 10.1002/jsfa.6518. Epub 2014 Jan 13. PMID: 24307341.
[24] LIU D-Y, et al. 2020. Soil Application of Zinc Fertilizer Increases Maize Yield by Enhancing the Kernel Number and Kernel Weight of Inferior Grains. Front. Plant Sci. 11:188. doi: 10.3389/fpls.2020.00188
[25] SARLACH Rashpal. Et al. 2013. Seed priming in wheat:Effect on seed germination, yield parameters and grain yield. Progressive Research. 8. 109-112.
[26] AMBREEN, S., et al. 2021. Seed priming with proline improved photosystem II efficiency and growth of wheat (Triticum aestivum L.). BMC Plant Biol 21, 502 . Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s12870-021-03273-2
[27] NAWAZ, et al. 2016.Seed priming improves stand establishment and productivity of no till wheat grown after direct seeded aerobic and transplanted flooded rice,European Journal of Agronomy,Volume 76,Pages 130-137,ISSN 1161-0301, Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.02.012.
[28] CHOUKRI M., et al. 2022. Zn application through seed priming improves productivity and grain nutritional quality of silage corn. Saudi journal of biological sciences, 29(12), 103456. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103456
[29] WANG X., et al. 2023. Nanoparticles in Plants: Uptake, Transport and Physiological Activity in Leaf and Root. Materials (Basel, Switzerland), 16(8), 3097. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ma16083097
[31] RHAMAN, M. S., et al. 2020. Seed Priming with Phytohormones: An Effective Approach for the

Mitigation of Abiotic Stress. Plants (Basel, Switzerland), 10(1), 37. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/plants10010037
[30] HAFEEZ ur Rehman, et al. 2015. Seed priming improves early seedling vigor, growth and productivity of spring maizeJournal of Integrative Agriculture,Volume 14, Issue 9, Pages 1745-1754,ISSN 2095-3119, Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)61000-5.

In silico a *in vitro* štúdia sexuálneho potenciálu asexuálnej *Euglena gracilis*

In silico and *in vitro* study of the sexual potential of asexual *Euglena gracilis*

Andrej Jedlička[1] – Dominika Vešelényiová[1] – Vanessa Gelanová[1]
Školiteľ: Juraj Krajčovič[1]
[1] Katedra biológie, FPV UCM, Hlavná 6, 919 51 Špačince,
jedlicka1@ucm.sk, dominika.veselenyiova@ucm.sk, gelanová1@ucm.sk, juraj.krajcovic@ucm.sk

Abstrakt
Pohlavné rozmnožovanie a jeho evolúcia sú úzko prepojené so vznikom eukaryotov, pričom prvými aktérmi tohto evolučného príbehu boli práve jednobunkové eukaryotické mikroorganizmy. Medzi rozmanitou skupinou zástupcov protíst, si práve euglenoidné bičíkovce vyslúžili významný záujem vďaka svojej jedinečnej regulácii génovej expresie a evolučnej trajektórii. Prítomnosť meiotických génov v genómoch organizmov je jedným z kľúčových parametrov, ktorý organizmom umožňuje pohlavne sa rozmnožovať. V tejto práci sme realizovali *in silico* analýzu a úvodné *in vitro* experimenty na identifikáciu prítomnosti esenciálnych meiotických génov v *Euglena gracilis*. Naše výsledky odhaľujú, že 8 z 9 esenciálnych meiotických génov bolo identifikovaných v genóme a transkriptóme *E. gracilis,* pričom len jeden, SPO11, doposiaľ nebol identifikovaný. Fylogenetická analýza, ktorú sme taktiež v rámci tejto práce realizovali, validuje tieto úvodné výsledky, ktoré ponúkajú nádej, a taktiež poskytujú úrodnú pôdu pre ďalšie *in vitro* experimenty, ktoré by mohli detailnejšie vysvetliť pôvod a evolúciu prvokov. Tento výskum prispieva k nášmu porozumeniu základných procesov, ktoré stoja za vznikom pohlavnej reprodukcie a poskytuje platformu pre budúce skúmania fascinujúceho sveta evolúcie zástupcov protíst.
Kľúčové slová: Euglenozoa, meióza, sexuálna reprodukcia, expresia génov

Abstract
Sexual reproduction and its evolution are closely linked to the origin of eukaryotes, with single-celled eukaryotic microorganisms being the first actors in this evolutionary story. Among the diverse group of protist representatives, it is the euglenoid flagellates that have earned significant interest due to their unique regulation of gene expression and evolutionary trajectory. The presence of meiotic genes in the genomes of organisms is one of the key parameters that allows organisms to reproduce sexually. In this work, we performed *in silico* analysis and initial in vitro experiments to identify the presence of essential meiotic genes in *Euglena gracilis*. Our results reveal that 8 of the 9 essential meiotic genes have been identified in the genome and transcriptome of *E. gracilis*, with only one, SPO11, not yet identified. The phylogenetic analysis we also performed in this work validates these initial results, which offer hope, and also provide fertile ground for further in vitro experiments that could explain the origin and evolution of protozoa in more detail. This research contributes to our understanding of the fundamental processes behind the origin of sexual reproduction and provides a platform for future investigations into the fascinating world of protist evolution.
Key Words: Euglenozoa, meiosis, sexual reproduction, gene expression

Úvod

V spoločenskom povedomí sa pojem "sex" väčšinou chápe ako označenie samotného sexuálneho aktu (kopulácie), no z biologického hľadiska má sex širší význam a je považovaný za významnú stratégiu prírody, ktorá zabezpečuje život na zemi už tisícky rokov. Etymologicky možno pôvod slova "sex" vystopovať až do 12. storočia, kedy vychádza z latinského slova "*seccare*", čo znamená rez, sekcia alebo delenie, a odkazuje na rozdiely medzi mužským a ženským pohlavím. Termín "sex" má rôzne pracovné významy a v závislosti od kontextu môže byť použitý vo vzťahu k popísaniu sexuálneho styku medzi jednotlivcami, taktiež v súvislosti s determináciou pohlavia (samčie/samičie) alebo v biologickom zmysle, čo možno stručne popísať ako formu genetickej výmeny alebo rekombinácie medzi rôznymi organizmami [1]. Na základe dostupných štúdií sa zdá, že meiotický sex

sa vyvinul na Zemi pred minimálne 1 miliardou rokov, keď začali prví predkovia eukaryotov "experimentovať" s výmenou genetického materiálu [2-4].

Zatiaľ čo pre zoológov je absencia sexu u skúmaných organizmov považovaná za takmer škandál, vedci študujúci prvoky, ktoré predstavujú väčšinu zachovanej eukaryotickej diverzity [5], sú oveľa ochotnejší akceptovať fakt, že určitý eukaryotický taxón nepreukazuje žiadny dôkaz sexuálnych procesov. Hoci je sex veľmi dobre zdokumentovaný v mnohých taxónoch prvokov a príslušníci niektorých taxónov, ako sú nálevníky (Alveolata), rozsievky (Stramenopiles) alebo zelené riasy (Chloroplastida), dokonca slúžia ako modelové organizmy na štúdium rôznych aspektov pohlavného rozmnožovania [6], priame pozorovanie sexuálnych procesov u väčšiny druhov prvokov chýba [7] a celé línie zástupcov protista zatiaľ nemožno považovať za sexuálne [8].

Funkcia meiózy je podmienená prítomnosťou špecifických génov, ktoré sú zakonzervované v genómoch sexuálne sa rozmnožujúcich eukaryotických organizmov. Na základe sekvenovania genómov a rozmachu bioinformatiky sa však ukázalo, že niektoré organizmy, ktoré sa síce zjavne rozmnožujú nepohlavne, vo svojich genómoch obsahujú taktiež gény, ktoré sú zodpovedné za realizáciu meiózy. Takýmto príkladom sú napríklad druhy rias *Chlorella variabilis* a *Ostreococcus spp*., u ktorých bola, napriek asexuálnemu spôsobu rozmnožovania, objavená takmer kompletná zostava esenciálnych meiotických génov [9-10]. Tieto zistenie by mohli nasvedčovať tomu, že existuje možnosť, že aj asexuálne druhy organizmov, medzi ktoré patria aj euglenoidné bičíkovce, sa za určitých podmienok dokážu rozmnožovať aj pohlavným spôsobom.

1 Metódy a materiály

Práca bola rozdelená na bioinformatickú a molekulárno- biologickú časť. V bioinformatickej časti sme analyzovali prítomnosť meiotických génov v genóme *E. gracilis* a v molekulárno-biologickej časti sme pracovali na dôkaze expresie meiotických génov u *E. gracilis in vitro*.

1.1 *In silico* časť práce

Na identifikáciu meiotických génov v genóme *E. gracilis* sme použili program Geneious Prime 2023.1.2, ktorý obsahuje množstvo nadstavieb, ktoré umožňujú realizovať komplexnú bioinformatickú analýzu. Pre identifikáciu meiotických génov v genóme *E. gracilis* sme použili transkripty meiotických génov, ktoré sme identifikovali v rámci prípravy diplomovej práce [11-12]. Transkriptómové sekvencie sme následne analyzovali prostredníctvom programu tblastn voči databáze obsahujúcej genóm *E. gracilis* s použitím parametrov, ktoré sú uvedené v tabuľke 1 (nepublikované dáta, 2023).

Tabuľka 1. Parametre použité pri analýze programom tblastn (transkriptómová sekvencia vs. genóm *E. gracilis*).

Parameter	Hodnota
Matrix	BLOSUM62
Gap cost (Open extend)	11 1
Max E-value	10
Max Target Seqs	10

Následne sme dostali jednotlivé blast „hity“, ktoré korešpondujú ku genómovým sekvenciám s určitým stupňom homológie k analyzovanej transkriptómovej sekvencii (Prílohy: Obr. A 1).

V následnom kroku sme genómové sekvencie jednotlivých meiotických génov, ktoré sme v predchádzajúcom kroku identifikovali programom tblastn, zrovnali s nukleotidovou sekvenciou identifikovanou v transkriptóme *E. gracilis* prostredníctvom programu Geneious Alignment s parametrami, ktoré sú uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2. Parametre použité pri zrovnaní genómovej a transkriptómovej sekvencie *E. gracilis* programom Geneious Alignment.

Parameter	Hodnota
Alignment type	Global alignment with free and gaps
Cost Matrix	Identity (1.0/0.0)
Gap open penalty	12
Gap extension	0

V zrovnaní sme vyznačili jednotlivé kódujuce úseky v genómovej sekvencii (CDS/Exóny), a taktiež 5´a 3´UTR regióny, čím sme pripravili génové anotácie meiotických génov (Prílohy: Obr. A. 2).

1.2 *In vitro* časť práce

V prvej časti sme pripravili Cramer – Myers (CM) médium, v ktorom prebiehala statická kultivácia kultúry *E. gracilis* [13] pri stálej teplote 24 °C, a taktiež za dvoch typov osvetlenia, kde paralelne prebiehala kultivácia za stáleho osvetlenia s intenzitou 30 µmol fotónov / $m^2 s^{-1}$, a taktiež v režime 12 hodín svetlo 12 hodín tma s rovnakou intenzitou ako pri

kultúre, ktorá bola kultivovaná za stáleho svetla. Zloženie média je v tabuľke 3.

Tabuľka 3. Príprava a zloženie CM média (upravené podľa Cramer a Myers, 1952)

Roztok	Zloženie	Návažok na prípravu zásobného roztoku	Objem zásobného roztoku
CM-1	$(NH_4)2HPO_4$ KH_2PO_4 trinátriumcitrát	100 g/l 100 g/l 64,5 g/l	10 ml
CM-2	$CaCl_2.2H_2O$	2,65 g/l	10 ml
CM-3	$MgSO_4.7H_2O$	20 g/l	10 ml
CM-4	$Fe_2SO_4.7H_2O$ $MnCl_2.4H_2O$ $CoCl_2.6H_2O$ $ZnSO_4.7H_2O$ $Na_2MoO_4.2H_2O$ $CuSO_4.5H_2O$	3 g/l 1,8 g/l 1,3 g/l 0,4 g/l 0,2 g/l 0,02 g/l	1 ml
Destilovaná voda			969 ml
Finálny objem CM média			1000 ml *

*pH média bolo upravené na 6,9

Kultivácia bunkových kultúr prebiehala v 200 ml sterilných kultivačných fľašiach, do ktorých sme pridávali 50 ml sterilného média. Pred naočkovaním jednotlivých kultúr, boli do média pridané dve zložky – vitamín B_1 a vitamín B_{12} (Tabuľka 4).

Tabuľka 4. Vitamíny, ktoré sú pridávané do média pri očkovaní vzoriek

Zloženie	Koncentrácia zložky / 1 ml média	Objem pridávaný do 50 ml média
Vitamín B_1	5 µl / 1 ml	250 µl
Vitamín B_{12}	0,2 µl / 1 ml	10 µl

1.3 Izolácia kompletnej RNA a DNA z bunkových kultúr *E. gracilis*

Pre izoláciu RNA sme použili komerčne dostupný kit TRI Reagent™ Solution (Thermo Scientific, USA).

V prvom kroku sme odobrali približne 5 ml kultúry *E. gracilis*, ktorá bola kultivovaná v CM médiu 4-7 dní. Túto kultúru sme 5 minút centrifugovali pri 1800 RPM. Po centrifugácii sme vzniknutý pelet resuspendovali v 1 ml Tri Reagent-u a následne nechali 5 minút inkubovať pri izbovej teplote. Následne sme pridali 0,2 ml chloroformu a vzorku premiešali 15 sekúnd prostredníctvom vortexu. Vzorku sme následne nechali 10 minút inkubovať pri izbovej teplote, po ktorých sme ju 15 minút centrifugovali pri 12000 g v chladenej centrifúge pri 4 °C. Po centrifugácii sa vzorka rozdelila do troch fáz: vrchnej, ktorá obsahovala RNA, strednej, ktorá obsahuje DNA a spodnej fázy, ktorá obsahuje proteíny. Strednú interfázu obsahujúcu DNA sme transformovali do novej mikroskúmavky a uschovali v chladničke pre ďalšie použitie. Následne sme opatrne odobrali vrchnú fázu obsahujúcu RNA. Pridali sme 0,5 ml izopropylu a premiešali na vortexe. Vzorku sme opäť zcentrifugovali 10 minút pri 12000 g v chladenej centrifúge pri 4 °C. RNA precipitát vytvoril pelet na bočnej spodnej strane mikroskúmavky. Supernatant sme vyliali a pelet resuspendovali v 1 ml 75 % etanolu, ktorý sme pripravili pomocou ultračistej vody. Na záver sme vzorku zcentrifugovali 5 minút pri 7500 g pri teplote 4 °C. Izolovanú RNA sme premiestnili do mrazničky kde sme ju uschovali pri teplote -80 °C.

Meranie koncentrácia vyizolovanej RNA a DNA a taktiež kontrola ich čistoty bola realizovaná prostredníctvom spektrofotometra NanoDrop™.

1.4 Prepis vyizolovanej RNA do cDNA

Prepis kompletnej RNA vyizolovanej z kultúry *E. gracilis* do cDNA bol realizovaný prostredníctvom kitu PrimeScript RT Reagent Kit® (Takara Bio, Japonsko).

Zloženie reagencie pre prepis RNA do cDNA je uvedené v tabuľke 5.

Tabuľka 5 (prvá časť) Zloženie pre master mix použitý na prepis RNA do cDNA

Reagent	Objem	Finálna koncentrácia
5X Prime Script Buffer	2 µl	1X
Prime Script RT Enzyme Mix I	0,5 µl	-
Random primers (100 µM)	0,5 µl	50 pmol
RNA	*	Do 500 ng
RNase Free dH_2O	*	-
Spolu	10 µl	-

* Objem kompletnej RNA závisí od koncentrácie vyizolovanej RNA. V prípade ak má Vyizolovaná RNA koncentráciu 500 ng/µl, pridáme do reagencie 1 µl

kompletnej RNA a 5,5 µl RNase Free dH_2O tak aby mala kompletná reagencia objem 10 µl.

Následne sme samotný prepis do cDNA realizovali prostredníctvom termocykléru. Program s teplotami, ktoré boli použité je uvedený v tabuľke 6.

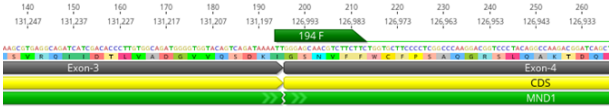
Tabuľka 6. Program použitý na prepis kompletnej RNA do cDNA

Teplota	Čas
37 °C	15 min
85 °C	5 s
4 °C	∞

Meranie koncentrácie pripravenej cDNA, a taktiež kontrola jej čistoty bola realizovaná prostredníctvom spektrofotometra NanoDrop™.

1.5 Návrh primerov pre PCR analýzy

Na *in vitro* potvrdenie expresie meiotických génov sme realizovali PCR analýzy. Primery pre tieto analýzy sme navrhli prostredníctvom programu Primer3, ktorý je k dispozícii ako nadstavba programu Geneious Prime. Všetky primery boli nadizajnované v cDNA v úsekoch exón → ~~intrón~~ → exón, tak aby sa čo najviac eliminovala možnosť off-target naviazanie primerov (Obr. 1).



Obr. 1 Dizajn forward primeru pre gén MND1. Primer bol umiestnený v úseku exón3 → ~~intrón~~ → exón 4.

Zoznam všetkých primerov je uvedený v prílohe v tabuľke A.1.

1.6 PCR analýza meiotických génov

Na detekciu expresie meiotických génov sme použili polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) s primermi uvedenými v tabuľke A.1 (v prílohe). Zloženie master mixu pre PCR je uvedené v tabuľke 7 a nastavenie jednotlivých cyklov reakcie je v tabuľke 8.

Tabuľka 7. Zloženie Master-mix pre 1 *colony* PCR.

Zložka	Množstvo (µl)
PrimeStar polymeráza (2x)	5
dH_20	3
cDNA (2 ng)	1
F+R primery (5pM)	0,5 + 0,5

Tabuľka 8. Protokol PCR reakcie.

Krok č.	Teplota	Čas	
1	98 °C	3:00	
2	98 °C	0:10	
3	50-70 °C	0:10	34x
4	72 °C	0:05	
5	72 °C	5:00	

Na správne určenie anelačnej teploty sme použili gradientovú PCR s gradientom od 50 °C po 70 °C.

Výsledné PCR produkty boli nanášané na horizontálnu elektroforézu s 1,5 % agarom a interkalačným farbivom SYBR Safe (Invitrogen). Ako štandard sa použil GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Elektroforéza prebiehala pri 100 V po dobu 40 minút.

2 Výsledky a diskusia

Prostredníctvom bioinformatických nástrojov sme v genóme *E. gracilis* identifikovali 8 z 9 esenciálnych meiotických génov. Jednotlivé anotované génové mapy génov identifikovaných v genóme *E. gracilis* sú uvedené v prílohe ako obrázok A.3. Parametre jednotlivých identifikovaných sekvencií sú uvedené v tabuľke 9.

Tabuľka 9. Parametre sekvencii meiotických génov identifikovaných v genóme *E. gracilis*

Gén	Dĺžka sekvencie (bp)	CDS (bp)	Počet exónov
REC8	28 766	1 521	20
HOP1	8 961	1 320	19
MND1	16 263	615	8
HOP2	15 458	1 041	18
DMC1	12 980	1 026	14
MER3	75 554	6 045	66
MSH5	23 607	2 325	30
MSH4	40 134	4 014	44

Jediným doposiaľ neidentifikovaným meiotickým génom nateraz zostáva gén SPO11, ktorý nebol taktiež identifikovaný ani v transkriptóme *E. gracilis*. Absencia génu SPO11 tak naďalej zostáva najpravdepodobnejším dôvodom toho, že sa *E. gracilis* rozmnožuje asexuálne. V rámci analýz, ktoré sme realizovali sme identifikovali určité fragmenty sekvencie, ktorá by mohla predstavovať sekvenciu SPO11 avšak pre nedostatok vstupných dát sme príslušnosť tejto sekvencie k SPO11 nemohli potvrdiť.

Problémom zostáva fakt, že gén SPO11 nebol identifikovaný ani na úrovni transkriptómu a keďže *E. gracilis*, až na veľmi vzácne výnimky, prepisuje všetky gény z úrovne genómu na úroveň transkriptómu, predpokladalo sa, že sa gén SPO11 nenachádzal ani v genóme tohto bičíkovca. Výsledky našich analýz však môžu naznačovať, že gén SPO11 je vo výbave *E. gracilis* ale za normálnych podmienok nedochádza k jeho prepisu na úroveň transkriptómu. Gén SPO11 u *E. gracilis* však môže byť exprimovaný v prípade ak bude bunka *E. gracilis* vystavená určitým neštandardným podmienkam spôsobených exogénnymi faktormi, ako napríklad nízka kultivačná teplota, odobratie určitej zložky z média, vystavenie chemikáliám a iné.

PCR analýzy pre jednotlivé meiotické gény boli realizované na *in vitro* identifikáciu meiotických génov v genóme a transkriptóme *E. gracilis*. Pre určenie správnych anelačných teplôt pre jednotlivé primery prislúchajúce ku konkrétnym génom sme realizovali gradientové PCR reakcie s gradientom 50 – 70 °C. Výsledky PCR analýz v podobe elektroforetogramov s jednotlivými anelačnými teplotami a dĺžkami PCR produktov, pre ktoré sme optimalizovali podmienky PCR reakcií sú uvedené v prílohe v tabuľke A.2. Prostredníctvom PCR analýz meiotických génov, ktoré sme predtým identifikovali v genóme *E. gracilis* bioinformatickou analýzou, sme potvrdili výsledky tejto analýzy *in vitro* u všetkých 8 génov. Keďže sme PCR analýzy realizovali v cDNA, ktorá bola predtým prepísaná z RNA, potvrdili sme, že pri meiotických génoch u E. gracilis dochádza k trankripcii z úrovne DNA na úroveň RNA. Toto zistenie potvrdzuje fakt, že *E. gracilis*, až na veľmi vzácne výnimky prepisuje všetky gény z úrovne DNA na úroveň RNA [14].

Záver

Prostredníctvom *in-silico* analýz sme identifikovali 8 z 9 esenciálnych meiotických génov v genóme *E. gracilis*. Jediným doposiaľ neidentifikovaným meiotickým génom nateraz zostáva gén SPO11, ktorého absencia môže spôsobovať aj absenciu sexuálneho rozmnožovania u *E. gracilis* Výsledky *in-silico* analýz nám poskytujú základ pre všetky nasledujúce *in vitro* analýzy, keďže vďaka ním môžeme realizovať napríklad simulácie PCR analýz.

V rámci výsledkov *in vitro* analýz sme optimalizovali podmienky PCR reakcie pre všetkých 8 identifikovaných meiotických génov. Tento výsledok potvrdzuje že pri *E. gracilis* dochádza k expresii esenciálnych meiotických génov aj napriek asexuálnemu typu rozmnožovania.

Poďakovanie

Táto práca bola pripravená s podporou projektu VEGA 1/0694/21.

Použitá literatúra

[1] Bernstein, H.*et al*. 1984. Origin of Sex. In. *Journal of Theoretical Biology*, 1984, roč. 110, č. 3, s. 323-351.

[2] Butterfield N. 2000. *Bangiomorpha pubescens* n. gen., n. sp.: Implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes. In. *Paleobiology*, 2000, roč. 26, č. 3, s. 386-404.

[3] Butterfield, N. 1990. A bangiophyte red alga from the proterozoic of arctic Canada. In. *Science*, 1990 roč. 250, č. 4977, s. 104-107.

[4] Gibson, T. *et al.* 2018. Precise age of *Bangiomorpha pubescens* dates the origin of eukaryotic photosynthesis. In. *Geology*, 2018, roč. 46, č. 2, s.135–138.

[5] Adl, S. *et al.* 2019. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. In. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2019, roč. 66, č. 1, s. 4-119.

[6] Cole, E. – Sugai, T. 2012 Developmental progression of *Tetrahymena* through the cellcycle and conjugation. In. *Methods Cell Biol,* 2012 *roč.* 109, s. 177–236.

[7] Lahr, D. *et al.* 2011. The chastity of amoebae: Re-evaluating evidence for sex in amoeboid organisms. In. *Proceedings in Biological Sciences*, 2011, roč. 278, s. 2081–2090.

[8] Speijer, D. *et al*., 2015 Sex is a ubiquitous, ancient, and inherent attribute of eukaryotic life. In. *PNAS*, 2015, roč. 112, č. 29, s. 8827-8834.

[9] Blanc, G. *et al.* 2010. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. In. *Plant Cell*, 2010, roč. 22, č.9, s. 2943-2955.

[10] Grimsley, N. *et al.* 2009. Cryptic sex in the smallest eukaryotic marine green alga. In. *Molecular Biology and Evolution*, 2009, roč. 27, č. 1, s. 47–54.

[11] JEDLIČKA, A. 2021. Otázka sexuálnej reprodukcie u euglenoidných bičíkovcov: diplomová práca, Trnava : UCM, 2021, 158 s.

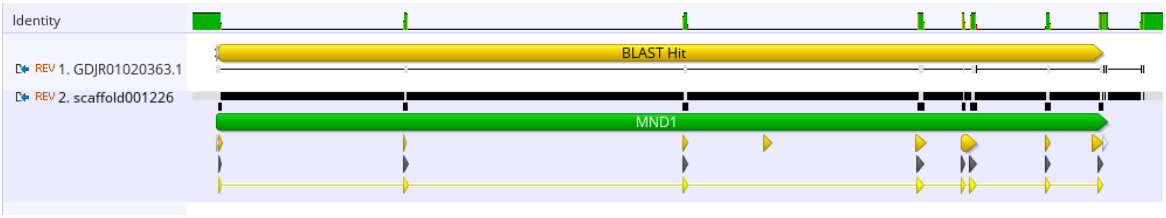
[12] Cordoba, J. et al., 2021 *De Novo* Transcriptome Meta-Assembly of the Mixotrophic Freshwater Microalga *Euglena gracilis.* In. Genes, 2021, roč. 12, č. 6, s. 842.

[13] CRAMER, M. - MYERS, J. 1952. Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*. In *Archiv für Mikrobiologie*, 1952, roč. 17, č. 1-4, s. 384-402.
[14] Vesteg, M. et al 2019. Comparative molecular cell biology of phototrophic euglenids and parasitic trypanosomatids sheds light on the ancestor of Euglenozoa. In. *Biological Reviews*, 2019, roč. 94, s. 1701-1721.

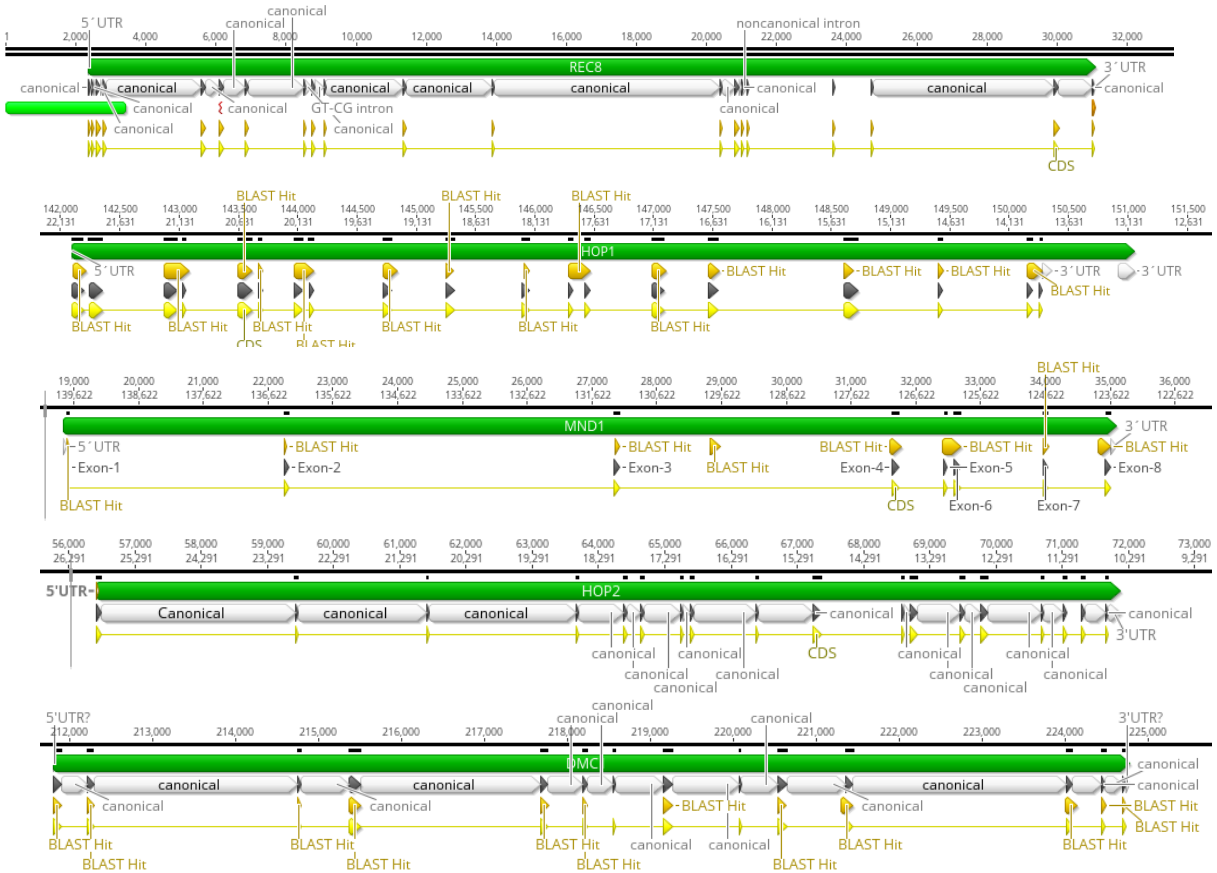
Prílohy



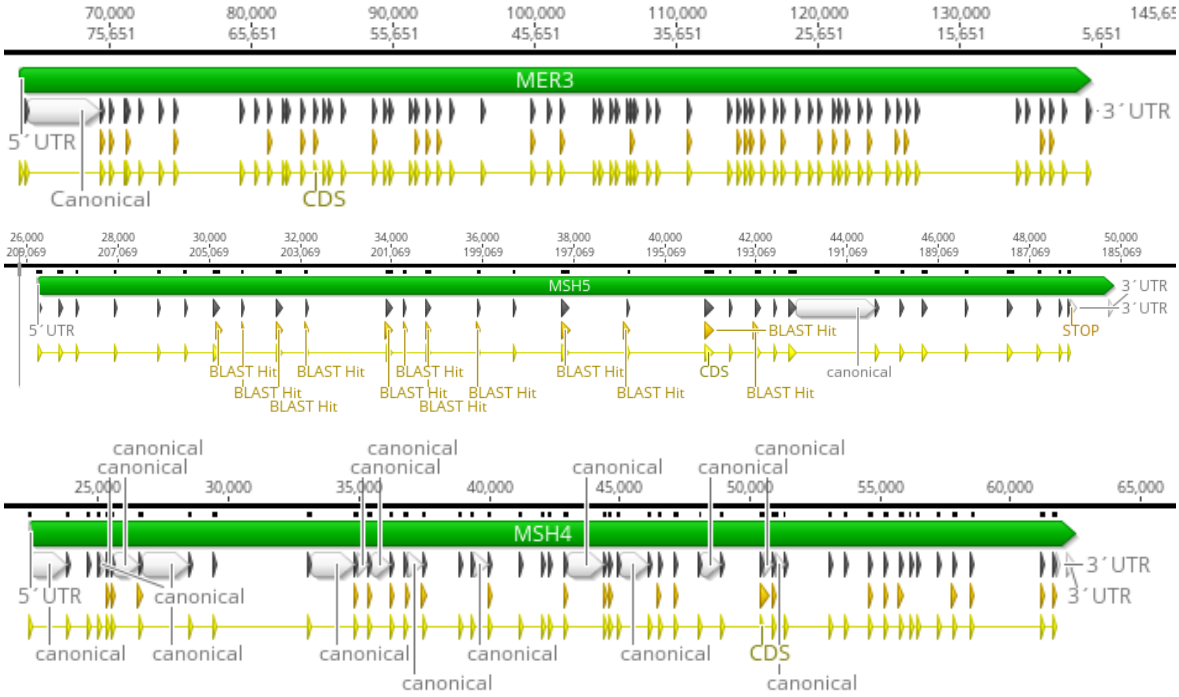
Obr. A.1 Výsledok analýzy transkriptómovej sekvencie meiotického génu MND1, ktorá bola analyzovaná prostredníctvom program tblasn voči genómu *E. graciis*. Jednotlivé skafoldy predstavujú genómovú sekvenciu vykazujúcu určitú homológiu k transkriptómovej sekvencii, ktorá bola analyzovaná



Obr. A.2 Zrovnanie genómovej (Scaffold001226) a transkriptómovej sekvencie (GDJR01020363.1). Zrovnané miesta na genómovej sekvencii predstavujú kódujúce časti sekvencie (exóny). Exóny sú na obrázku vyznačené tmavosivou šípkou.



Obr.A.3 (prvá časť) Anotované sekvencie meiotických génov identifikovaných v genóme *E. gracilis*. (V zelenej anotačnej šípke je uvedený názov génu, tmavošedou anotačnou šípkou sú označené exóny, bledošedou anotačnou šípkou kánonické intróny, oranžová šípka predstavuje blast „hity“ a žlźa anotácia predstavuje CDS).



Obr.A.3 (druhá časť) Anotované sekvencie meiotických génov identifikovaných v genóme *E. gracilis*. (V zelenej anotačnej šípke je uvedený názov génu, tmavošedou anotačnou šípkou sú označené exóny, bledošedou anotačnou šípkou kánonické intróny, oranžová šípka predstavuje blast „hity“ a žlíza anotácia predstavuje CDS).

Tabuľka A.1: Primery použité v PCR analýzach, ich označenie, účel, sekvencia, teplota anealingu a veľkosť očakávaného PCR produktu

Označenie	F/R	Sekvencia	PCR produkt (bp)	Gén
F-MND1 R-MND1	Forward Reverse	5´-TTGGGAGCAACGTCTTCTTC- 3´ 5´-TCCAATTTGGCCAGGAACTC-3´	274	MND1
F-HOP1 R-HOP1	Forward Reverse	5´-TGATGCTGAAGAACCTCACG-3´ 5´-CCGGGTACGTCACTTTGAAT-3´	279	HOP1
F-HOP2 R-HOP2	Forward Reverse	5´-GGACCTCAAGAAGCAGAAGG-3´ 5´-ATGTCCTTCGCCAAATCCTC-3´´	201	HOP2
F-DMC1 R-DMC1	Forward Reverse	5´-CAGTTGCCAAAGTCGATGGG-3´ 5´-GGTCAGCAACGAACAAAGCA-3´	415	DMC1
F-MER3 R-MER3	Forward Reverse	5´-AGTACCGCAACTTCGAGTTC-3´ 5´-CGCACTTCTTGTTGCTCATG-3´	345	MER3
F-MSH4 R-MSH4	Forward Reverse	5´-TGAGGCCCTTCCAGAAAAAC-3´ 5´-CAAATACGACGGCCTCAAGA-3´	299	MSH4
F-MSH5 R-MSH5	Forward Reverse	5´-ACAACAGCATTGACATCCGT-3´ 5´-GACCTGCAGTACATCGACAG-3´	311	MSH5
F-REC8 R-REC8	Forward Reverse	5´- CCATCGCTCTCTCAATTGCT-3´ 5´- TGGCTACCGCAATCTTCTTC-3´	304	REC8

Tabuľka A.2: Sumár výsledkov PCR analýz jednotlivých meiotických génov v *E. gracilis*

Gén	**DMC1**	**HOP1**	**HOP2**	**REC8**	**MND1**	**MER3**	**MSH4**	**MSH5**
PCR (cDNA)								
Ta (°C)	68,5 °C	68,5 °C	70 °C	68,5 °C	68,5 °C	70 °C	68,5 °C	68,5 °C
Dĺžka produktu (bp)	415 bp	279 bp	201 bp	304 bp	274 bp	345 bp	299 bp	311 bp

Stanovenie intracelulárne akumulovaného polyhydroxyalkanoátu v baktériách druhu *Cupriavidus necator* s využitím Sudan Black B

Determination of intracellular accumulated polyhydroxyalkanoate in *Cupriavidus necator* by Sudan Black B

Ľubomíra Jurečková[1] – Daniela Chmelová[1]
Školiteľ: Miroslav Ondrejovič[1]
[1]Oddelenie biotechnológií, Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
jureckova1@ucm.sk, daniela.chmelova@ucm.sk, miroslav.ondrejovic@ucm.sk

Abstrakt
Klasické metódy využívané na hodnotenie obsahu polyhydroxyalkanoátov (PHA) v produkčných bunkách sú časovo náročné a deštruktívne. Na rýchle monitorovanie priebehu fermentácie je preto potrebné nájsť jednoduchú, rýchlu, lacnú a efektívnu metódu, na základe ktorej by bolo možné koordinovať priebeh fermentačnej výroby PHA. Ako vhodná možnosť sa javí laboratórne využívaná farbiaca technika založená na lipofilnom azofarbive Sudan Black B. Preto cieľom tejto práce bolo overiť možnosť využitia Sudan Black B na hodnotenie obsahu PHA v biomase baktérií druhu *Cupriavidus necator*. V dosiahnutých výsledkoch sme pozorovali koreláciu medzi sorpciou Sudan Black B a obsahom PHA v bunkách producenta. Navrhovaná metóda tak predstavuje rýchlu metódu s veľkým potenciálom, ktorý by sa dal uplatniť hlavne pri rutinnom monitorovaní a rýchlej kvantifikácii PHA pri ich výrobe v priemyselnom meradle.

Kľúčové slová: *Cupriavidus necator*, fermentácia, polyhydroxyalkanoáty, farbenie, Sudan Black B

Abstract
Classical methods used to evaluate the content of polyhydroxyalkanoates (PHA) in production cells are time-consuming and destructive. Therefore, it is necessary to find a simple, fast, cheap and effective method for quick monitoring of the fermentation process. A laboratory-used dyeing technique based on the lipophilic azo-dye Sudan Black B appears to be a suitable option. Therefore, the aim of this work was to verify the possibility of using Sudan Black B to evaluate the PHA content in the biomass of *Cupriavidus necator*. In the obtained results, we observed a correlation between the sorption of Sudan Black B and the PHA content in the production cells. The proposed method thus represents a fast technique with great potential, which could be applied mainly in the routine monitoring and rapid quantification of PHA during their production in an industrial scale.

Key Words: *Cupriavidus necator*, fermentation, polyhydroxyalkanoates, staining, Sudan Black B

Úvod

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) predstavujú skupinu biopolyesterov, ktoré sú akumulované v rôznych druhoch mikroorganizmov ako zásoba uhlíka a energie. V intracelulárnom priestore buniek sa nachádzajú v podobe granúl, pričom ich počet a veľkosť závisí tak od genetickej predispozície produkčného organizmu ako aj kultivačných podmienok, ktorým bol organizmus počas rastu vystavený.

PHA sa dostali do pozornosti širokej verejnosti hlavne vďaka svojim priaznivým technologickým a úžitkovým vlastnostiam, akými sú biodegradovateľnosť, biokompatibilita, nerozpustnosť vo vode, dobrá odolnosť voči UV žiareniu a termoplasticita. Na základe vyššie spomínaných vlastností sa javia ako vhodná alternatíva k v súčasnosti využívaným syntetickým plastom. Svoje uplatnenie našli v poľnohospodárstve, ako mulčovacie fólie s riadeným uvoľňovaním agrochemikálií, v potravinárstve, ako jednorazové obaly potravín, v chemickom priemysle, ako prekurzory pre výrobu chemikálií a biopalív, ale aj v zdravotníctve, ako medicínske náhrady a implantáty alebo nosiče liečiv.

Masívnemu využívaniu PHA však stále bráni ich príliš vysoká cena, ktorá je v porovnaní s cenou konvenčných plastov na báze ropy niekoľkonásobne vyššia. Možnosťou ako znížiť ich cenu na konkurencieschopnú úroveň by mohlo byť

zušľachťovanie metód izolácie a purifikácie vytvoreného biopolyméru, ale predovšetkým využívanie druhotných odpadových surovín ako lacných zdrojov uhlíka. Keďže tieto suroviny sú spravidla heterogénne, je potrebné na efektívne riadenie fermentačného procesu produkcie PHA z týchto surovín mať k dispozícii rýchlu a lacnú metódu hodnotenia obsahu cieľového polyméru v bunkovej biomase producenta.

Vo všeobecnosti je možné obsah PHA v bunkách producentov hodnotiť rôznymi metódami. Najstaršie metódy sú založené na priamom gravimetrickom hodnotení PHA po jeho extrakcii organickými rozpúšťadlami z biomasy [1, 2]. Tento spôsob hodnotenia obsahu PHA kopíruje postup ich izolácie po ukončení fermentačnej výroby. Hoci sa považuje za štandardnú metódu hodnotenia obsahu PHA v bakteriálnej biomase, negatívom zostáva časová náročnosť tejto metódy a veľká nepresnosť vznikajúca predovšetkým pri nízkych koncentráciách PHA v hodnotenej biomase [3]. Na zlepšenie presnosti je možné použiť veľké objemy vzoriek a viacero paralelných opakovaní, avšak aj napriek tomu výsledky nie je možné považovať za operatívne využiteľné pre riadenie fermentačného procesu vzhľadom na dobu trvania danej analýzy. Novšie metódy sú založené na chromatografickom alebo fotometrickom hodnotení rozkladných produktov vznikajúcich derivatizáciou východiskového PHA. Najčastejšie využívanou je analýza pomocou plynovej chromatografie (GC), ktorá zahŕňa simultánnu extrakciu a metanolýzu PHA v mierne kyslých alebo alkalických podmienkach za vzniku metylesterov hydroxyalkanoátov, ktoré sú potom analyzované pomocou GC [4]. Okrem tejto metódy je možné hodnotiť obsah polyhydroxybutytáru (PHB) aj fotometrickým stanovením kyseliny krotónovej, ktorá vzniká po opracovaní produkčnej biomasy v silne kyslom prostredí [5], prípadne kvapalinovou chromatografiou (LC) [6, 7, 8] alebo infračervenou spektroskopiou s Fourierovou transformáciou (FTIR) [9, 10, 11]. Hlavnými nevýhodami týchto metód sú investičné a prevádzkové náklady na ich realizáciu a časová náročnosť, ktorá neumožňuje operatívnu kontrolu obsahu PHA počas jeho produkcie. Navyše pomocou hodnotenia kyseliny krotónovej je možné stanoviť len PHB a nie ostatné druhy PHA [12, 13].

Oveľa rýchlejšími metódami hodnotenia PHA v bunkách producentov sú metódy založené na selektívnom farbení lipofilných častí buniek Nílskou modrou, Nílskou červenou alebo Sudan Black B [14, 15, 16, 17]. Zatiaľ čo Nílska modrá a červená sú fluorescenčne aktívne farbivá a vyžadujú si pre stanovenie fluorimeter, odozvu farbiva Sudan Black B je možné hodnotiť pomocou štandardného laboratórneho fotometra.

Prvotné experimenty realizované so Sudan Black B v súvislosti s detekciou PHA boli používané na histologické farbenie bakteriálnych kultúr určených na analýzu elektrónovým mikroskopom [18, 19, 20]. Porras a kol. (2017) po prvýkrát popísali využitie Sudan Black B pre kvantitatívne hodnotenie obsahu PHA v bunkách [12]. Z ich výsledkov je zjavné, že existuje korelácia medzi obsahom PHA a znížením obsahu Sudan Black B vo farbiacom roztoku. Keďže sa táto metóda javí ako rýchla a z pohľadu vyžadovanej prístrojovej infraštruktúry a chemikálií aj ako lacná metóda, cieľom tejto práce bolo overiť možnosť hodnotenia obsahu PHA v bunkách baktérií druhu *C. necator* pomocou farbenia lipofilných granúl farbivom Sudan Black B.

1 Materiál a metódy

V tejto časti si opíšeme použitý materiál na výskum ako aj metódy a postupy, využité pri práci.

1.1 Produkčný organizmus

Ako produkčný organizmus sme zvolili bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* DSM 545, ktorý patrí medzi prirodzených producentov PHA a vyznačuje sa vysokou akumuláciou PHA (až do 80% (w/w)) a celkovej hmotnosti biomasy počas fermentácie [21, 22, 23, 24]. Bakteriálnu kultúru *C. necator* DSM 545 sme získali z Nemeckej zbierky mikroorganizmov a bunkových kultúr GmbH (DSM, Nemecko). Baktérie sme uchovávali pri teplote 30℃ na mäsopeptónovom agare (MPA) s prídavkom 1% (w/v) agaru s pravidelným preočkovávaním v 7-dňových intervaloch.

1.2 Príprava produkčného média

Na prípravu biomasy *C. necator* sme použili médium podľa Küng (1982) [25] s modifikáciami popísanými v práci Jurečková a kol. (2023), v ktorej sme sa zaoberali optimalizáciou podmienok kultivácie daných baktérií [26]. Médium pozostávalo z roztoku minerálnych zložiek ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, KH_2PO_4, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, citronan železito-amónny) a organického zdroja uhlíka a energie, ktorým bola glukóza.

Takto pripravené kultivačné médiá boli následne sterilizované v autokláve pri 121℃ počas 20 minút, pričom roztok glukózy bol sterilizovaný oddelene a do

kultivačných médií bol pridaný až po sterilizácii. Takto pripravené kultivačné médiá boli po ochladení naočkované prídavkom bakteriálnej suspenzie v pomere 1:60 (v/v) s optickou hustotou buniek 5,1 McFarlandových jednotiek (*z angl.* McFarland unit - MFU). Kultivácia prebiehala pri teplote 30℃ počas 7 dní dynamickým spôsobom v 100 ml Erlenmayerových bankách v objeme produkčného média 30 ml.

1.3 Spracovanie biomasy a hodnotenie obsahu PHA v biomase

Po ukončení kultivácie boli médiá prenesené do vopred odvážených centrifugačných skúmaviek s objemom 50 ml a následne odstredené pri 4000 rpm počas 20 minút. Supernatant bol odstránený a získaná biomasa bola premytá destilovanou vodou. Mokrá biomasa bola sušená v teplovzdušnej sušiarni pri teplote 50℃ do konštantnej hmotnosti.

PHA v produkčných bunkách *C. necator* sme po ukončení kultivácie stanovili metódou priamej derivatizácie PHA v bunkovej biomase a hodnotením vytvorených derivátov pomocou GC/FID. K 5 mg získanej biomasy sme pridali 2 ml chloroformu a 2 ml okysleného metanolu (3% (v/v) roztok H_2SO_4 v metanole). Zmes sme inkubovali počas 2 hodín pri teplote 100℃. Po ochladení sme k zmesi pridali 1 ml destilovanej vody a po premiešaní a vydelení dvoch fáz bola spodná (chloroformová) fáza použitá na analýzu pomocou GC.

2 µl vzorky sme následne nastrekli do injektoru vyhriateho na 250℃. Separácia prebiehala na kapilárnej kolóne DB-23 (60 m x 0,25 mm), pričom ako nosný plyn sme využívali dusík (N_2) s prietokom 30 ml/min. Počiatočná teplota pece bola T_1 = 80℃ a udržiavala sa po dobu 1 minúty. Následne sa teplota zvyšovala rýchlosťou 8℃ /min. až do dosiahnutia T_2 = 200℃, ktorá sa udržiavala počas 5 minút. Detekcia separovaných látok sa realizovala pomocou plameňového ionizačného detektoru vyhriateho na teplotu 270℃. Koncentráciu PHB vo vzorke sme vypočítali na základe plochy píkov s daným retenčným časom (5,56 min.) získaných pomocou štandardných roztokov P3HB v rozsahu 1 – 10 g/l.

1.4 Spektrofotometrické hodnotenie obsahu PHA v biomase s využitím Sudan Black B

V jednotlivých podkapitolách si opíšeme vplyvy a metódy, ktoré sme využili pri skúmaní spektra Sudan Black B.

1.4.1 Vplyv prostredia na spektrum Sudan Black B

Vplyv prostredia na spektrum Sudan Black B bol hodnotený v rozpúšťadlách potenciálne využiteľných pre stanovenie PHA pomocou daného farbiva. Konkrétne sa jednalo o 70, 80, 90 a 96% (v/v) vodné roztoky etanolu. Kalibračné krivky pre hodnotenie vplyvu prostredia boli zhotovené v koncentračnom rozmedzí 0,02 – 0,2 g/l a absorbancia pripravených roztokov bola stanovená v mikrotitračných platničkách v objeme 200 µl pri vlnových dĺžkach od 400 do 700 nm.

1.4.2 Priama metóda hodnotenia PHA pomocou Sudan Black B

Pri priamej metóde hodnotenia obsahu PHA v produkčných bunkách sme využili roztok Sudan Black B s koncentráciami 100 a 200 mg/l pripravený v 70% (v/v) vodnom roztoku etanolu. Roztoky sme pridali v objeme 1 ml k 100 mg sušiny biomasy. Zmes sme nechali dynamicky premiešavať pri laboratórnej teplote po dobu 24 hodín. Po ukončení sorpcie sme zmes odstredili pri 10 000 rpm počas 5 minút. V získanom supernatante sme stanovili absorbanciu pri vlnovej dĺžke 600 nm a vypočítali koncentráciu Sudan Black B.

1.4.3 Nepriama metóda hodnotenia PHA pomocou Sudan Black B

Pri nepriamej metóde hodnotenia obsahu PHA v biomase *C. necator* sme využili biomasu po sorpcii Sudan Black B, z ktorej sme sorbované farbivo uvoľnili pomocou 96% (v/v) etanolu v objeme 1 ml na 100 mg sušiny biomasy. Zmes sme nechali premiešavať pri laboratórnej teplote po dobu 24 hodín. Po ukončení desorpcie sme zmes odstredili pri 10 000 rpm počas 5 minút. Uvedený postup desorpcie sme následne dvakrát zopakovali, čím sme pripravili tri desorpčné frakcie. V získaných supernatantoch sme stanovili absorbanciu pri vlnovej dĺžke 600 nm a vypočítali koncentráciu Sudan Black B.

1.5 Štatistické vyhodnotenie výsledkov

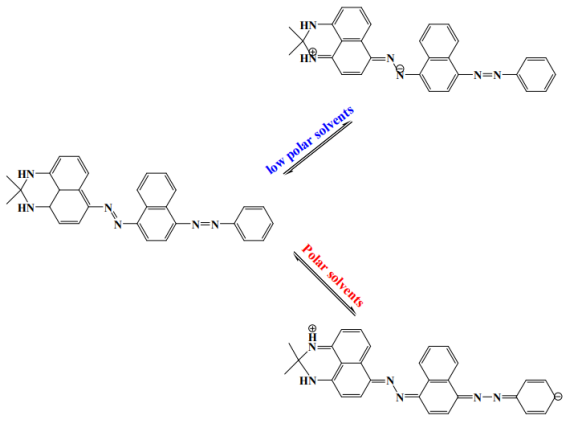
Všetky výsledky sme analyzovali a vyhodnotili pomocou programu Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA). Každý experiment bol realizovaný v troch paralelných pokusoch.

2 Výsledky a diskusia

V tejto kapitole si opíšeme dosiahnuté výsledky práce a porovnáme ich so stanoveným cieľom práce.

2.1 Vplyv prostredia na spektrum Sudan Black B

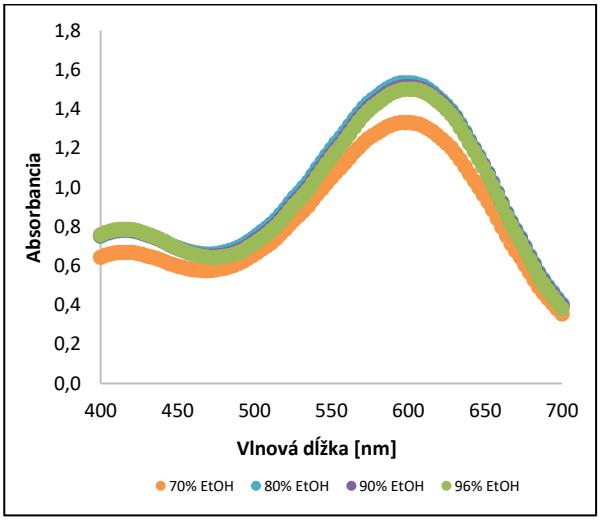
Na základe informácií získaných z dostupnej literatúry o skupine azofarbív, akými sú Sudan III, Sudan IV a Sudan Black B, je zjavné, že vplyvom prostredia dochádza k zmene ich molekulárnej štruktúry [27, 28]. Sudan Black B, na rozdiel od ostatných azofarbív patriacich do tejto skupiny, nie je schopná tvoriť hydrazónové tautomérne formy. Avšak pozorované odlišnosti v spektre Sudan Black B v rôznom prostredí (v polárnych a mierne polárnych rozpúšťadlách) naznačuje vznik rôznych rezonančných štruktúr Sudan Black B v závislosti od použitého rozpúšťadla. V polárnych rozpúšťadlách pravdepodobne voľné elektróny dusíku v polohe 3 1,3-hydropyrimidínovej funkčnej skupiny prispievajú k posunom elektrónov na jednom z aromatických kruhov naftalénu (Obr. 1). Protické rozpúšťadlá umožňujú aktivovať -NH skupinu v štruktúre Sudan Black B, čo znamená, že v polárnych rozpúšťadlách, na rozdiel od mierne polárnych rozpúšťadiel, sa znižuje stabilita excitovaného stavu ich molekuly [28]. Navyše vznikom prechodného stavu štruktúry daného farbiva môže dochádzať k zmene intenzity viazania farbiva na lipofilné štruktúry bunkovej biomasy.



Obr. 1: Štruktúrne formy Sudan Black B v rôznych rozpúšťadlách.
Zdroj: [28]

Keďže pri farbení lipofilných častí bunkovej biomasy rôznych organizmov, predovšetkým pre histologické účely, sa používal etanol a jeho vodné roztoky (predovšetkým 70% (v/v) vodný roztok etanolu), pred samotným stanovením PHA v bunkovej biomase *C. necator* bolo nevyhnutné analyzovať vplyv vybraných rozpúšťadiel na spektrálne vlastnosti Sudan Black B. Za týmto účelom sme pripravili roztoky Sudan Black B vo vodných roztokoch etanolu (70, 80, 90 a 96%) v koncentračnom rozsahu 0,02 – 0,20 g/l a hodnotili absorpčné spektrum od 400 do 700 nm.

Na základe našich výsledkov (Graf 1) je zjavné, že v prípade roztoku Sudan Black B v 70% (v/v) vodnom roztoku etanolu dochádza v porovnaní s ostatnými hodnotenými prostriedkami (80, 90 a 96% (v/v) vodný roztok etanolu) k poklesu absorbancie. Tento posun je možné vysvetliť zmenou štruktúry Sudan Black B vplyvom zvýšenej koncentrácie vody v prostredí (Obr. 1). K podobným záverom dospeli Zakerhamidi a kol. (2015), ktorí pozorovali tento efekt aj v ďalších rozpúšťadlách, ktoré sa ešte viac líšili svojou polaritou, a preto solvatochromatický vplyv na sudánové azofarbivá bol výraznejší [28]. Preto pri hodnotení priebehu sorpcie alebo desorpcie Sudan Black B je nevyhnutné používať selektívne kalibračné krivky v závislosti od použitej koncentrácie etanolu v prostredí. Navyše je možné v prípade 70% (v/v) vodného roztoku etanolu predpokladať aj odlišný spôsob a mieru interakcie Sudan Black B s lipofilnými časťami bunkovej biomasy. Zatiaľ čo 70% etanol by mal byť vhodnejší na sorpčné experimenty, 96% etanol by mal lepšie uvoľňovať farbivo z biomasy.



Graf 1: Spektrálna analýza roztokov Sudan Black B s koncentráciou 0,08 g/l vo vodných roztokoch etanolu.
Zdroj: Autori

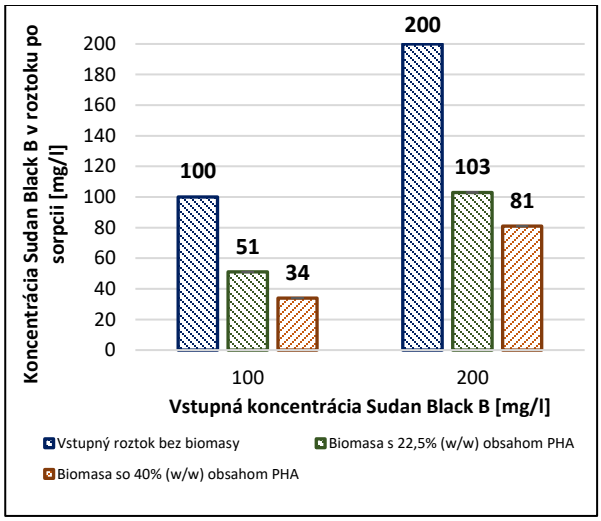
2.2 Stanovenie obsahu PHA pomocou Sudan Black B

Bakteriálna biomasa *C. necator* obsahuje okrem PHA aj iné lipofilné zlúčeniny (predovšetkým bunková membrána), ktoré sú schopné interagovať s farbivom Sudan Black B. Tieto zlúčeniny, podobne ako PHA, sú spravidla akumulované v špecifických častiach bunkovej hmoty, ktoré je možné definovať ich špecifickým povrchom schopným viazať dané farbivo. Keďže vzťah medzi špecifickým povrchom farbených častí bunky a úbytkom farbiva z roztoku nebol doteraz hodnotený, použili sme na definovanie toho vzťahu tak priamu, ako aj nepriamu metódu hodnotenia obsahu PHA v bunkách *C. necator*. Zatiaľ čo priama metóda je založená na hodnotení priameho úbytku farbiva vo farbiacom roztoku, ktorý by mal byť úmerný obsahu PHA vo farbenej biomase, nepriama metóda hodnotí farbivo uvoľnené z farbenej biomasy v rámci desorpčných experimentov.

2.2.1 Priama metóda hodnotenia PHA pomocou Sudan Black B

Pri hodnotení priamej metódy stanovenia obsahu PHA v produkčných bunkách *C. necator* pomocou azofarbiva Sudan Black B sme na sorpciu použili dve vzorky bakteriálnej biomasy, v ktorých sa pohyboval obsah PHA stanovený pomocou GC/FID analýzy na úrovni 22,5 a 40,0% (w/w), a dva roztoky Sudan Black B s koncentráciami 100 a 200 mg/l (oba pripravené v 70% (v/v) etanole).

V prípade biomasy s obsahom PHA 22,5% (w/w) sme pozorovali pokles koncentrácie farbiva v roztoku z pôvodných 100 mg/l na hodnotu 51 mg/l, čo predstavovalo sorpciu farbiva na úrovni 0,49 mg/g biomasy. V prípade roztoku so vstupnou koncentráciou 200 mg/l sme pozorovali pokles až na koncentráciu 103 mg/l, čo predstavuje sorpciu na úrovni 0,97 mg/g biomasy (Graf 2).



Graf 2: Porovnanie koncentrácie Sudan Black B v supernatante získanom po sorpcii na biomasu s obsahom PHA na úrovni 22,5% (zelený stĺpec) a 40,0% (hnedý stĺpec) (w/w) suchej hmotnosti pri rôznej vstupnej koncentrácii roztoku Sudan Black B v 70% (v/v) etanole.
Zdroj: Autori

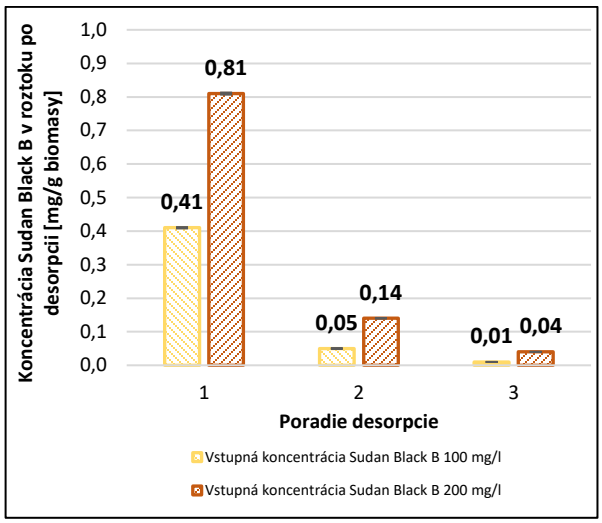
V prípade biomasy s obsahom PHA 40,0% (w/w) sme po ukončení sorpcie v roztoku so vstupnou koncentráciou Sudan Black B 100 mg/l pozorovali pokles na hodnotu 34 mg/l, z čoho vyplýva, že došlo k sorpcii na úrovni približne 0,66 mg/g bunkovej biomasy. V prípade roztoku so vstupnou koncentráciou 200 mg/l sme pozorovali pokles na 81 mg/l (Graf 2), čo predstavuje sorpciu na úrovni 1,19 mg/g biomasy. Je evidentné, že v oboch prípadoch, tak v prípade použitia 100 ako 200 mg/l došlo k zvýšeniu miery sorpcie bakteriálnou biomasou s vyšším obsahom PHA.

Dosiahnuté výsledky podporujú východiskovú hypotézu, že Sudan Black B je možné použiť nielen pre kvalitatívne hodnotenie producentov PHA pri ich histologickom vyšetrení, ale je možné ju tiež použiť na kvantitatívne zhodnotenie obsahu PHA v bunkovej biomase počas fermentácie. K podobným záverom dospeli vo svojej práci aj Porras a kol. (2018), ktorí pracovali s baktériami druhu *Bacillus megaterium* a zaznamenali koreláciu medzi sorpciou Sudan Black B a obsahom PHA v intracelulárnom priestore buniek [13].

2.2.2 Nepriama metóda hodnotenia PHA pomocou Sudan Black B

Pri hodnotení nepriamej metódy stanovenia obsahu PHA v produkčných bunkách *C. necator* s využitím

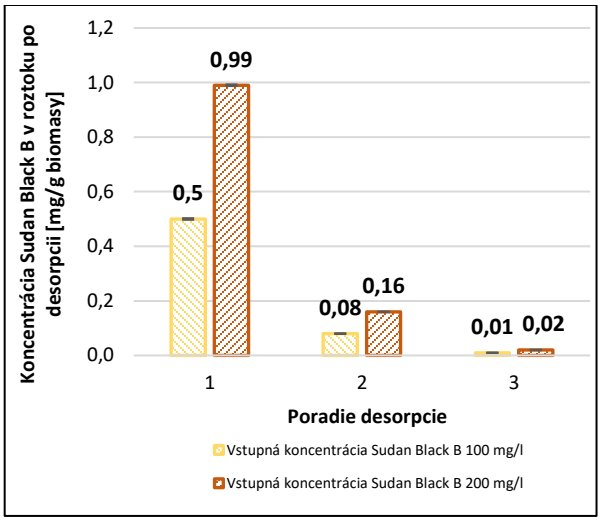
Sudan Black B sme na desorpciu použili 96% (v/v) vodný roztok etanolu. V roztokoch získaných desorpciou sme následne stanovili koncentráciu prítomného farbiva. Na základe získaných údajov sme pozorovali podobný trend, aký bol evidentný aj pri priamej metóde. Výsledky experimentov sú zobrazené v Grafoch 3 a 4.



Graf 3: Porovnanie desorbovaného podielu Sudan Black B z biomasy obsahujúcej PHA na úrovni 22,5% pri rôznej vstupnej koncentrácii farbiaceho roztoku Sudan Black B použitím 96% (v/v) vodného roztoku etanolu. Zdroj: Autori

V prípade biomasy s obsahom PHA 22,5% (w/w) sme pozorovali uvoľnenie farbiva po troch desorpčných cykloch na úrovni 0,47 a 0,99 mg/g biomasy, čo približne korešponduje s východiskovým obsahom farbiva zachyteného na biomasu počas sorpčného experimentu pri použití farbiaceho roztoku so Sudan Black B v koncentráciách 100 a 200 mg/l (Graf 3).

Podobne to bolo aj v prípade biomasy s obsahom PHA 40,0% (w/w), v prípade ktorej sme dosiahli po troch desorpčných cykloch uvoľnené farbivo na úrovni 0,59 a 1,17 mg/g biomasy. To naznačuje, že tromi desorpčnými cyklami v 96% (v/v) vodnom roztoku etanolu je možné uvoľniť takmer všetko viazané farbivo Sudan Black B (Graf 4).



Graf 4: Porovnanie desorbovaného podielu Sudan Black B z biomasy obsahujúcej PHA na úrovni 40,0% pri rôznej vstupnej koncentrácii farbiaceho roztoku Sudan Black B použitím 96% (v/v) vodného roztoku etanolu. Zdroj: Autori

Tieto pilotné experimenty naznačujú, že použitý systém je vhodný na stanovenie obsahu PHA rýchlou a lacnou metódou, avšak na jej využitie pre kontrolu procesu produkcie PHA v priemyselnom meradle by bolo vhodné ju modifikovať tak, aby bolo možné popísanú závislosť merať nielen v sušine biomasy, ale priamo v biomase v natívnom stave.

Záver

Využitie spektrofotometrickej analýzy pri detekcii obsahu intracelulárne akumulovaného PHA v bunkách producentov s využitím Sudan Black B sa javí ako vhodná rýchla alternatíva k štandardne využívaným metódam. V prípade priamej aj nepriamej metódy sme pozorovali významnú koreláciu medzi obsahom Sudan Black B v supernatante a obsahom PHA v bunkách. Vzhľadom na dosiahnuté výsledky budú nasledujúce experimenty zamerané na hodnotenie možnosti využitia týchto metód pri natívnej biomase.

Poďakovanie

Táto práca vznikla za finančnej podpory projektov APVV-18-0420 a FPPV-04-2024.

Použitá literatúra

[1] ARAMVASH, Asieh – ZAVAREH, Fatemeh Moazzeni – BANADKUKI, Narges Gholami. 2018. Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. In

Engineering in Life Sciences, vol. 18, no. 1, pp. 20-28. ISSN 1618-2863.

[2] PEREIRA, João R. et al. 2019. Demonstration of the adhesive properties of the medium-chain length polyhydroxyalkanoate produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* from glycerol. In International Journal of Biological Macromolecules, vol. 122, pp. 1144-1151. ISSN 0141-8130.

[3] LAFFERTY, Roisin M. – KORSATKO, B. – KORSATKO, Werner. 1988. Microbial production of poly-β-hydroxybutyric acid. In Biotechnology, vol. 6, pp. 135-176. ISSN 1682-2978.

[4] BRAUNEGG, Gerhart – SONNLEITNER, B. – LAFFERTY, Roisin M. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-n-hydroxybutyric acid in microbial diversity. In Europeaan Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 6, no. 1, pp. 29-37. ISSN 0171-1741.

[5] LAW, John H. – SLEPECKY Ralph A. 1961. Assay of poly-β-hydroxybutyric acid. In Journal of Bacteriology, vol. 82, no. 1, pp. 33-36.ISSN 1098-5530.

[6] KICHISE, Tomoyasu – TAGUCHI, Seiichi – DOI, Yoshih. 2002. Enhanced accumulation and changed monomer composition in polyhydroxyalkanoate (PHA) copolyester by *in vitro* evolution of *Aeromonas caviae* PHA synthase. In Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, no. 5, pp. 2411-2419. ISSN 0099-2240.

[7] GRUBELNIK, Andreas et al. 2008. A simple HPLC-MS method for the quantitative determination of the composition of bacterial medium chain-length polyhydroxyalkanoates. In Journal of Separation Science, vol. 31, no. 10, pp. 1739-1744. ISSN 1615-9306.

[8] SATOH, Hiroyasu et al. 2016. Application of the alkaline-digestion-HPLC method to the rapid determination of polyhydroxyalkanoate in activated sludge. In Journal of Water and Environment Technology, vol. 14, no. 5, pp. 411-421. ISSN 1348-2165.

[9] HONG, Kihyon et al. 1999. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. In Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 51, pp. 523-526. ISSN 1432-0614.

[10] BHUWAL, Anish Kumari et al. 2013. Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes. In International Journal of Biomaterials, 752821. ISSN 1687-8795.

[11] RAKKAN, Thanaphorn – CHANA, Netnapa – SANGKHARAK, Kanokphorn. 2021. The Integration of textile wastewater treatment with polyhydroxyalkanoate production using newly isolated *Enterobacter* strain TS3. In Waste and Biomass Valorization, vol. 13, pp. 571-582. ISSN 1877-2641.

[12] PORRAS, Mauricio A. – VILLAR, Marcelo A. – CUBITTO, María A. 2017. Novel spectrophotometric technique for rapid determination of extractable PHA using Sudan black dye. In Journal of Biotechnology, vol. 255, pp. 28-32. ISSN 1873-4863.

[13] PORRAS, Mauricio A. – VILLAR, Marcelo A. – CUBITTO, María A. 2018. Improved intracellular PHA determinations with novel spectrophotometric quantification methodologies based on Sudan black dye. In Journal of Microbiological Methods, vol. 148, pp. 1-11. ISSN 0167-7012.

[14] SCHLEGEL, Hans G. – LAFFERTY, Roisin – KRAUSS, Isaac. 1970. The isolation of mutants not accumulating poly-β-hydroxybutyric acid. In Archiv für Mikrobiologie, vol. 71, no. 3, pp. 283-294. ISSN 0003-9276.

[15] OSTLE, Anthony G. – HOLT, John G. 1982. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyric acid. In Applied and Environmental Microbiology, vol. 44, no. 1, pp. 238-241. ISSN 1098-5336.

[16] GORENFLO, Volker M. et al. 1999. Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. In Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 51, pp. 765-772. ISSN 1432-0614.

[17] SPIEKERMANN, Patricia et al. 1999. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. In Archives of Microbiology, vol. 171, pp. 73-80. ISSN 1432-072X.

[18] HARTMAN, T. L. 1940. The Use of Sudan Black B as a bacterial fat stain. In Stain Technology, vol. 15, no. 1, pp. 23-28. ISSN 0038-9153.

[19] WEI, Yu-Hong et al. 2011. Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. In International Journal of Molecular Sciences, vol. 12, pp. 252-265. ISSN 1422-0067.

[20] BACHA, Samar et al. 2023. Exploring *Bacillus amyloliquefaciens* strain OM81 for the production

of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastic using olive mill wastewater. In 3 Biotech, vol. 13, no. 12, 415. ISSN 2190-5738.

[21] ŠPOLJARIĆ, Ivna Vrana et al. 2013. *In silico* optimization and low structured kinetic model of poly[(R)-3- hydroxybutyrate] synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 by fed-batch cultivation on glycerol. In Journal of Biotechnology, vol. 168, no. 4, pp. 625-635. ISSN 1873-4863.

[22] YOUSUF, Rawa G. – WINTERBURN, James B., 2016. Date seed characterisation, substrate extraction and process modelling for the production of polyhydroxybutyrate by *Cupriavidus necator*. In Bioresource Technology, vol. 222, pp. 242-251. ISSN 0960-8524.

[23] ZHILA, Natalia O. et al. 2021. Properties of degradable polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesized by a new strain, *Cupriavidus necator* IBP/ SFU-1, from various carbon sources. In Polymers, vol.13, no. 18, 3142. ISSN 2073-4360.

[24] KISELEV, Evgeniy G. et al. 2022. Sugar beet molasses as a potential C-substrate for PHA production by *Cupriavidus necator*. In Bioengineering, vol. 9, no. 4, 154. ISSN 2306-5354.

[25] KÜNG, Wen. 1982. Wachstum und poly-D-(-)-3-hydroxybuttersäure – akkumulation bei *Alcaligenes latus*: master thesis. Graz: Graz University of Technology.

[26] JUREČKOVÁ, Ľubomíra – CHMELOVÁ, Daniela – ONDREJOVIČ, Miroslav. 2023. The effect of cultivation conditions on polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator*. In Študentská vedecká konferencia 2023: zborník recenzovaných príspevkov. Banská Bystrica: Fakulta prírodných vied a informatiky, Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre; Fakulta prírodných vied, Univerzita Mateja Bela v Banskej Bystrici; Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, pp. 39-44. ISBN 978-80-558-2024-8.

[27] SEETOHUL, Lalitesh Nitin – ALI, Zulfigur – ISLAM, Meez. 2009. Liquid-phase broadband cavity enhanced absorption spectroscopy (BBCEAS) studies in a 20 cm cell. In The Analyst, vol. 134, no. 9, pp. 1887-1895. ISSN 2326-4020.

[28] ZAKERHAMIDI, Mohammad Sadegh – AHMADIAN, Seyed Masood – KIAN, Roshanak. 2015. The specific and nonspecific solvatochromic behavior of Sudan dyes in different solvents. In Canadian Journal of Chemistry, vol. 93, no.6, pp. 639-647. ISSN 1480-3291.

Molekulárna charakterizácia dvoch slovenských izolátov vírusu viniča A (rod *Vitivirus*)

Molecular characterization of two Slovak isolates of grapevine virus A (genus *Vitivirus*)

Jana Kemenczeiová[1] – Peter Alaxin[1] – Lukáš Predajňa[2] – Miroslav Glasa[1,2]
Školiteľ: Miroslav Glasa[1,2]
[1] Ústav biológie a biotechnológií, Oddelenie biológie, Fakulta prírodných vied, UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
[2] Virologický ústav, Biomedicínske centrum SAV, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava
kemenczeiova1@ucm.sk, alaxin1@ucm.sk, lukas.predajna@savba.sk, miroslav.glasa@savba.sk

Abstrakt
Vírus viniča A (GVA) je patogén patriaci do rodu *Vitivirus*, čeľade *Betaflexiviridae*, ktorý infikuje vinič hroznorodý (*Vitis vinifera* L.). Prenáša sa mechanickým spôsobom alebo semiperzistentne prostredníctvom hmyzích vektorov. V prípade koinfekcie s inými vírusmi spôsobuje veľké ekonomické straty pre vinohradnícky priemysel. Cieľom našej práce bola celogenómová analýza GVA v dvoch slovenských vzorkách viniča (SK803 a SK805) prostredníctvom analýzy virómu masívnym paralelným sekvenovaním (NGS). Bioinformatickou analýzou sme získali kompletné kódujúce sekvencie GVA SK803 a SK805, ktoré vykázali 89,5% vzájomnú podobnosť a vysokú fylogenetickú príbuznosť. Získané *in silico* dáta boli následne overené metódou RT-PCR. Celkové RNA izolované z pôvodných environmentálnych vzoriek sa použili ako templát pre amplifikáciu pomocou primerov, ktoré nasadajú na oblasť kódujúcu obalový proteín (CP) a proteín viažuci nukleovú kyselinu (NB). Výsledné amplikóny (645 bp) sme sekvenovali Sanger dideoxy metódou, ktorá potvrdila identitu vírusového druhu a na vyšetrovanom úseku GVA genómu potvrdila NGS sekvenciu. Zo získaných sekvencií sme vykonali fylogenetickú analýzu s inými izolátmi z databázy, na základe ktorej sme zistili, že oba slovenské izoláty sú fylogeneticky príbuzné a sú zatriedené do rovnakého klastra.
Kľúčové slová: GVA, RT-PCR, sekvenovanie, vinič

Abstract
Grapevine virus A (GVA) is a pathogen belonging to the genus Vitivirus, family Betaflexiviridae, which infects the grapevine (Vitis vinifera L.). It is transmitted mechanically or semi-persistently through insect vectors. In case of co-infection with other viruses, it causes great economic losses for the wine industry. The goal of our work was genome-wide analysis of GVA in two Slovak grapevine samples (SK803 and SK805) through virome analysis by massively parallel sequencing (NGS). By bioinformatic analysis, we obtained the complete coding sequences of GVA SK803 and SK805, which mutually showed 89.5% similarity and high phylogenetic relatedness. The obtained in silico data were subsequently verified by the RT-PCR method. Total RNAs isolated from environmental samples were used as a template for amplification using primers that anneal to the coat protein (CP) and nucleic acid binding protein (NB) coding regions. We sequenced the resulting amplicons (645 bp) using the Sanger dideoxy method, which confirmed the identity of the virus species and confirmed the NGS sequence on the investigated genome section. From the obtained sequences, we performed a phylogenetic analysis with available isolates from the database, on the basis of which we found that both Slovak isolates are phylogenetically related and are classified in the same cluster.
Key Words: grapevine, GVA, RT-PCR, sequencing.

Úvod

Vírusy patria medzi najvýznamnejšie patogény infikujúce vinič hroznorodý (*Vitis vinifera* L.) [1]. Doteraz bolo identifikovaných viac ako 80 rôznych vírusov infikujúcich vinič, čo je viac ako pri akejkoľvek inej poľnohospodárskej plodine [2]. Naviac, toto číslo neustále rastie vďaka použitiu sekvenovania novej generácie (NGS, známa tiež ako masívne paralelné sekvenovanie) na identifikáciu nových patogénnych druhov [3]. Infekcie jednotlivými vírusmi a zmiešané infekcie viacerými vírusmi, ktoré sa tiež bežne vyskytujú vo viniči, sú zodpovedné za značné a trvalé ekonomické straty pre vinohradnícky a vinársky

priemysel na celom svete [4, 5, 6, 7, 8]. Symptómy ochorenia spôsobené patogénnymi vírusmi viniča sa značne líšia, môžu byť príčinou spomaleného rastu a vývinu rastliny, škvrnitosti listov, chlorózy, nekrózy, pruhovitých a prstencových škvŕn na listoch, zviňovania listov, zmeny farby listov (žltnutie alebo sčervenanie), zvráskavenia, jamkovitosti alebo ryhovania dreva [3]. Rod *Vitivirus* z čeľade *Betaflexiviridae* bol zavedený nedávno a jeho názov je odvodený od hostiteľa viniča, pričom jeho najrozšírenejším členom je vírus viniča A (angl. *Grapevine virus A*, GVA). Virióny GVA predstavujú ohybné vláknité častice, ktorých genóm pozostáva z monopartitnej, lineárnej, pozitívnej jednovláknovej RNA o dĺžky 7,3 – 7,4 kb s výnimkou poly-A chvosta. Molekula RNA má päť otvorených čítacích rámcov (ORF), kódujúcich polyproteín (ORF1), polypeptid (ORF2) s neznámou funkciou, pohybový proteín (ORF3), obalový proteín (CP) (ORF4) a proteín viažúci nukleovú kyselinu (ORF5) [9, 10, 11, 12]. Vírus je experimentálne mechanicky prenosný na bylinných hostiteľov. V prírode sa prenáša hmyzími vektormi – červcami (*Pseudococcus*, *Planococcus*, *Heliococcus, Neopulvinaria)*, puklicami (*Parthenolecanium)*, voškami *(Cavariella, Ovatus*) semiperzistentným spôsobom, avšak neexistujú žiadne informácie o prenose patogénu semenami [12, 13]. Samotný vírus sa vyznačuje širokou molekulárnou heterogenitou, pretože sa počas jeho replikácie objavujú mutácie a rekombinácie v dôsledku mechanizmov replikácie náchylných na chyby, čo môže viesť aj k jeho kvázidruhovej populácii. Vysoká miera mutácií umožňuje vírusu prispôsobovať sa hostiteľovi a prostrediu, preto je štúdium genetickej diverzity vírusovej populácie nevyhnutné pre pochopenie epidemiológie vírusu, jeho šíreniu a môže poskytnúť informácie nevyhnutné k prijímaniu účinných kontrolných opatrení [14, 15].

1 Materiál a metódy

V tejto časti si opíšeme použitý materiál a metódy, ktoré boli potrebné pri práci na výskume.

1.1. Vzorky viniča a izolácia RNA, NGS a fylogenetická analýza

Dva izoláty GVA charakterizované v tejto práci sme získali z rastlín viniča (*V. vinifera* L.) (SK803 – *V. vinifera* cv. Pálava, SK805 - *V. vinifera* cv. Veltiner, SK809 - V. *vinifera* cv. Welshriesling, SK704 – *V. vinifera* cv. Veltliner) z lokality Pezinok. Celkovú RNA sme extrahovali z lyka odobratého z dormantných odrezkov pomocou súpravy Spectrum ™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a pred ďalšou analýzou boli vzorky RNA skladované pri -80 °C. Následne sme vírusovú frakciu obohatili depléciou hostiteľských nukleových kyselín použitím súpravy Zymo-Seq RiboFree kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Takto opracovanú RNA sme použili na syntézu cDNA použitím súpravy SuperScript II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a súpravou na prípravu knižníc na báze trasnpozónov (Nextera XT, Illumina, San Diego, CA, USA), po ktorej nasledovala NGS analýza na platforme Illumina MiSeq. Kompletné sekvencie GVA izolátov SK803 a SK805 sme porovnali s ostatnými izolátmi GVA dostupnými v databáte GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sekvenčné analýzy sme uskutočnili pomocou bioinformatického programu MEGA 7.0 [16].

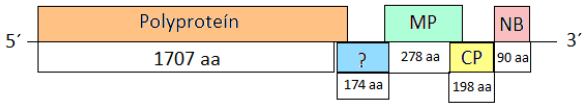
1.2 RT-PCR a Sangerovo sekvenovanie

Celkové RNA izolované zo vzoriek viniča sme použili ako templáty pre dvojkrokovú RT-PCR. Prvý reťazec cDNA sme syntetizovali reverznou transkripciou celkovej RNA s použitím hexamérnych náhodných DNA primerov a AMV reverznej transkriptázy (oba od Promega, Madison, WI, USA). Alikvót cDNA sme potom použili ako templát v štandardnej PCR na kompletnú amplifikáciu vírusovej sekvencie pomocou TaKaRa Ex Taq polymerázy (Takara Bio Inc., Shiga, Japonsko) a GVA-špecifického páru primerov GVA_7180R 5´-CTTCCCTCTTTCACGAACC-3´ a GVA_6535F 5´ -CTCTCTTYGGGTACATCGC-3-´. Podmienky cyklovania PCR boli nasledujúce: počiatočná denaturácia 95° počas 1 minúty, 40 cyklov (denaturácia pri 95°C 15s, anelácia 57°C 30s, polymerizácia 72°C 1 minúta) a finálna polymerizácia pri 72°C počas 5 minút. Amplifikované fragmenty PCR sme potom analyzovali štandardnou elektroforézou v 0,8% géli (UltraPureTM Agarose-1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Vybrané amplikóny sme následne purifikovali z gélu pomocou súprav Wizard®SVGel a PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). Purifikované produkty PCR sme podrobili Sangerovmu sekvenovaniu s použitím rovnakých GVA-špecifických primerov, ako sa použili pri RT-PCR.

2 Výsledky a diskusia

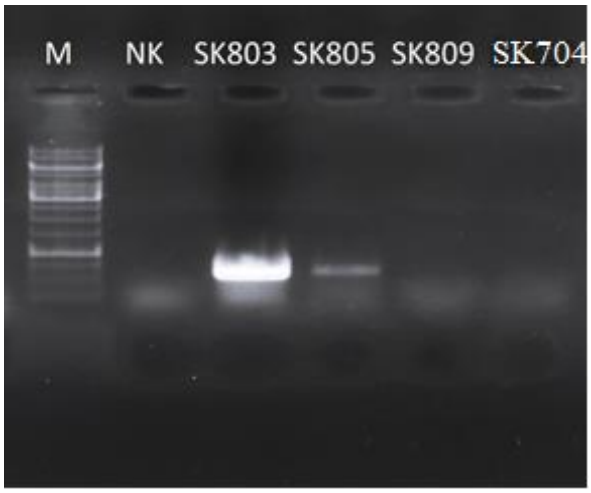
Analýzou virómu sme vo vzorkách SK803 a SK805 identifikovali zmes rôznych vírusov (Grapevine rupestris stem pitting- associated virus, Grapevine

leafroll- associated virus- 1, Grapevine Pinot gris virus, Grapevine virus T) a viroidu (Hop stunt viroid), vrátane GVA, ktorý dovtedy nebol na Slovensku celogenómovo charakterizovaný. Porovnanie získaných kompletných sekvencií ukázalo 89,5% identitu medzi SK803 a SK805, pričom najviac odlišností sme pozorovali v ORF1 kódujúcom replikačný polyproteín. Po preložení sekvencie polyproteínu do aminokyselinovej sekvencie a po ich zrovnaní sme zistili prítomnosť 54 substitúcií. Je známe, že RNA vírusy sa vyznačujú vysokou mierou mutácií vyplývajúcou z chýbajúcej „proofreading" aktivity ich RNA- závislej RNA polymerázy (Obr. 1) [19].



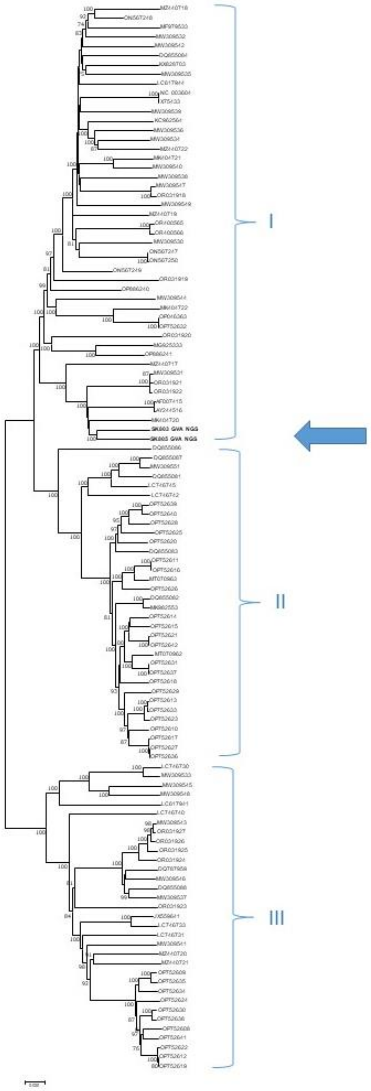
Obr.1: Schéma genómu GVA_SK803 a SK805

Na základe dostupných úplných sekvencií v databáze GenBank bol navrhnutý nový pár primerov, ktoré nasadajú na oblasť dvoch tretín CP a na NB. Pomocou daných primerov GVA_5635F/ GVA_7180R sa zo všetkých 4 analyzovaných vzoriek amplifikoval produkt očakávanej veľkosti (645 bp) v dvoch vzorkách (SK803 a SK805) (Obr. 2). Produkty RT-PCR boli priamo sekvenované, aby sa získala hlavná sekvencia charakterizujúca prítomnosť vírusu v rastline.



Obr.2: RT-PCR detekcia GVA zo vzoriek viniča – vzorky SK803 a SK805 boli pozitívne, kontrolné vzorky SK809 a SK704 boli negatívne na prítomnosť vírusu. M- marker molekulovej hmotnosti, NK- negatívna kontrola.

Fylogenetická analýza (Obr. 3) s využitím kompletných sekvencií SK803 a SK805 a dostupných predtým charakterizovaných izolátov GVA, pre ktoré boli sekvencie dostupné dokázala, že GVA SK803 a SK805 sú fylogeneticky príbuzné a sú zatriedené do rovnakého klastra I. Molekulárne najbližším izolátom bol GVA TT2017-74-47 izolovaný z viniča odrody „Pinot noir" vo Francúzsku (MK404720).



Obr. 3: Fylogenetická analýza SK803 a SK805 (ich klastrovanie označuje šípka).

Alabi et al. [20] sa zaoberali genetickou diverzitou GVA z vinohradov vo Washingtone a v Kalifornii. Skonštruovali fylogenetický strom izolátov GVA s využitím nukleotidových sekvencií odvodených od RdRp a CP získaných z ich štúdie a zodpovedajúcich sekvencií izolátov dostupných vo verejnej databáze

GenBank. Celkovo bolo porovnaných 105 sekvencií (Kalifornia – 50, Washington – 35, GenBank – 20), ktoré boli následne rozdelené do štyroch fylogenetických skupín s hodnotami bootstrapu viac ako 70%. Izoláty Is151 (X75433) a GTG11-1 (DQ855084) sa na základe sekvencie odvodenej od RdRp a CP nachádzali vo fyloskupine I ako aj v nami zostrojenom fylogenetickom strome.

Predajňa et al. [18] sa vo svojej práci zaoberali parciálnou genomickou analýzou izolátov GVA pochádzajúcich zo Slovenska a z Českej Republiky. Na základe nukleotidovej analýzy zahrňujúcej CP a ORF5 zistili, že väčšina slovenských izolátov patrila do skupiny I.

Záver

Vinič hroznorodý (*Vitis vinifera* L.) je spomedzi pestovaných trvácich plodín hostiteľom najväčšieho počtu vírusov. Doteraz bolo na viniči identifikovaných viac ako 80 rôznych vírusových a subvírusových patogénov. Výsledkom našej práce bola genomická analýza GVA, kde sme zistili, že slovenské izoláty SK803 a SK805 sú fylogeneticky príbuzné a podobné (nukleotidová identita bola 89,5%) a líšia sa najmä v oblasti ORF1. Fylogenetickou analýzou sme dokázali, že patria do rovnakej fylogenetickej skupiny a molekulárne najbližším izolátom je izolát pochádzajúci z Francúzska. Získané výsledky môžu byť využité na optimalizáciu detekčných techník, či validáciu vylepšených špecifických a citlivých nástrojov pre účely rutinnej diagnostiky.

Poďakovanie

Táto práca bola podporená projektom APVV-22-0067 a grantom FPPV-07-2024.

Použitá literatúra

[1] MARTELLI, G. P. – PADIEU, B. E. 2006. Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographic report 1998-2004. In Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches, no. 55, pp. 279. ISSN 1016-1228

[2] MANNINI, F. – DIGIARO, M. 2017. The Effects of Viruses and Viral Diseases on Grapes and Wine. In Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management, pp. 453 – 82. DOI: 10.1007/978-3-319-57706-7_23

[3] ZHERDEV et al. 2018. Methods for the Diagnosis of Grapevine Viral Infections: A Review. In Agriculture, vol. 8, no. 12, pp. 195. DOI: 10.3390/agriculture8120195

[4] CHARLES et al. 2006. A review of the ecology of grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV-3). In New Zealand Plant Protection, vol. 59, pp. 330 – 337. DOI: 10.30843/nzpp.2006.59.4590

[5] CREDI, R. – BANINI, A. R. 1997. Effects of Virus and Virus-Like Infections on Growth, Yield, and Fruit Quality of Albana and Trebbiano Romagnolo Grapevines. In American Journal of Enology and Viticulture, vol. 48, no. 1, pp. 7- 12. DOI: 10.5344/ajev.1997.48.1.7

[6] KOMAR et al. 2010. Comparative Performance of Virus-Infected Vitis vinifera cv. Savagnin rose Grafted onto Three Rootstocks. In American Journal of Enology and Viticulture, vol. 61, no. 1, pp. 68 – 73. DOI: 10.5344/ajev.2010.61.1.68

[7] RICKETTS et al. 2015. Reducing the Economic Impact of Grapevine Leafroll Disease in California: Identifying Optimal Disease Management Strategies. In American Journal of Enology and Viticulture, vol 66, no. 2, pp. 138 – 147. DOI: 10.5344/ajev.2014.14106

[8] ATALLAH et al. 2012. Economic Impact of Grapevine Leafroll Disease on Vitis vinifera cv. Cabernet franc in Finger Lakes Vineyards of New York. In Americal Journal of Enology and Viticulture, vol. 63, no. 1, pp. 73 – 79. DOI: 10.5344/ajev.2011.11055

[9] MINAFRA et al. 1997. Grapevine virus A: nucleotide sequence, genome organization, and relationship in the Trichovirus genus. In Archives of Virology, vol. 142, no. 2, pp. 417 – 23. DOI: 10.1007/s007050050088

[10] GALIAKPAROV et al. 2003. Functional analysis of the grapevine virus A genome. In Virology, vol. 306, no. 1, pp. 42 – 50. DOI: 10.1016/s0042-6822(02)00019-3

[11] Du PREEZ et al. 2011. The grapevine-infecting vitiviruses, with particular reference to grapevine virus A. In Archives of Virology, vol. 156, pp. 1495 – 1503. DOI: 10.1007/s00705-011-1071-3

[12] LARA et al. 2023. Potential Implications and Management of Grapevine Viruses in Mexico: A Review. In International Journal of Plant Biology, vol. 14, no. 1, pp. 177 – 189. DOI: 10.3390/ijpb14010015

[13] PREEZ et al. 2011. The grapevine-infecting vitiviruses, with particular reference to grapevine virus A. In Archives of Virology, vol. 156, pp. 1495 – 1503. DOI: 10.1007/s00705-011-1071-3

[14] GOSZCYNSKI DE, JOOSTE AEC. 2003. Identification of divergent variants of grapevine virus A. In European Journal of Plant Pathology, vol. 109, pp. 397 – 403. DOI: 10.1023/A:1023555018700
[15] WU et al. 2024. Genetic Diversity of Grapevine Virus A in Three Australian Vineyards Using Amplicon High Throughput Sequencing (Amplicon-HTS). In Viruses, vol. 16, no. 1, pp. 42. DOI: 10.3390/v16010042
[16] TAMURA et al. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. In Molecular Biology and Evolution, vol. 30, pp. 2725 – 2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197
[17] KOMINEK et al. 2008. An RNA probe for the detection of Grapevine virus A. In Journal Phytopathology, vol. 156, pp. 762 – 764. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2008.01446.x
[18] PREDAJŇA et al. 2015. Partial Sequence Analysis of Geographically Close Grapevine virus A Isolates Reveals their High Regional Variability and an Intra-Isolate Heterogeneity. In Journal of Phytopathology, vol. 164, pp. 427 – 431. DOI: 10.1111/jph.12432
[19] GLASA et al. 2011. Sequence Variability, Recombination Analysis, and Specific Detection of the W Strain of Plum pox virus. In Phytopathology, vol. 108, no. 8, pp. 980 – 985. DOI: 10.1094/phyto-12-10-0334
[20] ALABI et al. 2014. Genetic Diversity of Grapevine virus A in Washington and California Vineyards. In Phytopathology, vol. 104, no. 5, pp. 548 – 560. DOI: 10.1094/phyto-06-13-0179-R

Štúdium rozdielov v orálnom mikrobióme medzi nefajčiarmi a fajčiarmi v slovenskej populácii

A study of differences in the oral microbiome between the group of non-smokers and smokers in the Slovak population

Renáta Kozáčiková[1] – Dominika Vešelényiová[1]
Školiteľ: Juraj Krajčovič[1]
[1]Oddelenie biológie, Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM, Námestie J. Herdu 577/2, 917 01 Trnava
kozacikova1@ucm.sk, dominika.veselenyiova@ucm.sk, juraj.krajcovic@ucm.sk

Abstrakt
Orálna dutina človeka je kolonizovaná viac ako 700 rôznymi mikrobiálnymi druhmi, ktorých rovnováha napomáha k udržiavaniu zdravia ústnej dutiny, ako aj systémového zdravia. Zmena v zložení kolonizujúcich mikróbov môže byť zapríčinená viacerými faktormi (nedostatočná ústna hygiena, fajčenie alebo genetické predispozície) a vedie k zvýšeniu imunitnej odpovede a tým aj k vzniku zápalu. Viaceré štúdie popisujú rozdiely v diverzite orálnej mikrobioty u fajčiarov a nefajčiarov. V dôsledku fajčenia dochádza v ústnej dutine ku zúženiu ciev a k zníženiu produkcie slín, ktoré sú asociované so zvýšeným rizikom vzniku parodontitídy či rakoviny ústnej dutiny a pečene.

Cieľom predloženej práce je sledovať rozdiely v zložení orálneho mikrobiómu vo vzorkách slín medzi skupinami fajčiarov a nefajčiarov v slovenskej populácii do 25 rokov a analýzou zápalových molekúl objasniť vplyv tabaku na zdravie človeka. Komplexným štúdiom zloženia orálneho mikrobiómu a zápalových markerov bude možné lepšie pochopiť interakcie medzi hostiteľom, jeho orálnym mikrobiómom a celkovým zdravým človeka.

Kľúčové slová: orálny mikrobióm, zápal, fajčenie, paropatogénne baktérie

Abstract
The human oral cavity is colonized by over 700 different microbial species, the balance of which contributes to maintaining both oral and systemic health. Changes in the composition of colonizing microbes can be triggered by various factors (insufficient oral hygiene, smoking, or genetic predispositions), leading to an increased immune response and inflammation. Several studies highlight differences in the diversity of oral microbiota between groups of smokers and non-smokers. Smoking narrows blood vessels in the oral cavity and reduces saliva production, factors associated with an elevated risk of periodontitis and oral cavity and liver cancers.

This study aims to analyse differences in the oral microbiome composition in saliva among smokers and non-smokers in the Slovak population up to 25 years of age. The secondary goal is to elucidate the impact of tobacco on human health through the analysis of inflammatory molecules. By analysing of oral microbiome composition and inflammatory markers, we seek a deeper understanding of the interactions between the host, his oral microbiome, and overall health.

Key Words: oral microbiome, inflammation, smoking, periopathogenic bacteria

1 Úvod

Orálna dutina človeka má po gastrointestinálnom trakte, druhú najväčšiu a najviac druhovo variabilnú mikrobiotu, ktorá pozostáva z viac ako 700 druhov baktérií, húb, vírusov, pričom sú prítomné aj Archea a prvoky. Avšak iba 54 % z týchto druhov je kultivovateľných a identifikovaných, 14 % predstavujú kultivovateľné druhy, ktoré neboli doposiaľ identifikované, a až 32 % sa nedá kultivovať v laboratórnych podmienkach [1].

Mikrobióm orálnej dutiny je považovaný za veľmi dynamický, nakoľko sa neustále mení a je vystavovaný vdychovaným aj požitým mikróbom. Zloženie orálneho mikrobiómu sa líši medzi jedincami, ale jeho hlavná funkcia je u každého človeka rovnaká. Komenzálny mikrobióm predstavuje dobre vyvážený, dynamický ekosystém, ktorý má vo všeobecnosti tendenciu držať sa v rámci svojich typických hodnôt, a zohráva dôležitú úlohu pri udržiavaní orálneho a systémového zdravia [2]. Odchýlenie od množstva či zloženia jednotlivých bakteriálnych druhov v orálnom mikrobióme vytvára dysbiózu. Vznik dysbiózy uvedeného spoločenstva

môže byť podmienený viacerými faktormi, ako sú nedostatočná ústna hygiena, stravovacie návyky, genetické predispozície, pridružené ochorenia (*diabetes mellitus*, AIDS, Crohnová choroba), alebo fajčenie. V dôsledku pôsobenia uvedených faktorov dochádza k zvýšeniu imunitnej odpovede jedinca, a tým aj k vzniku zápalu. Dlhodobá zvýšená imunitná odpoveď môže viesť nielen k ochoreniam parodontu, ale môže aj zapríčiniť vznik rôznych systémových ochorení, napr. kardiovaskulárne ochorenia, reumatoidná artritída, prípadne môže navodiť psychiatrické poruchy [3].

Na základe súčasnej odbornej literatúry sa popisuje fajčenie cigariet ako významný faktor, ktorý mení zloženie mikrobioty v orálnej dutine. Viaceré štúdie popisujú rozdiely v diverzite orálnej mikrobioty medzi skupinami fajčiarov a nefajčiarov. Ústna dutina je prvá časť tela, ktorá prichádza do kontaktu so cigaretovým dymom. Práve tento dym obsahuje množstvo toxických látok, vrátane nikotínu, vďaka ktorému dochádza v ústnej dutine ku vazokonstrikcii [4]. Toxické látky prítomné v cigaretovom dyme pôsobia bakteriostatickým a baktericídnym účinkom na baktérie kolonizujúce orálnu dutinu, a tým spôsobujú nedostatok prísunu kyslíka v jednotlivých tkanivách. Práve zníženie hladiny kyslíka v tkanivách orálnej dutine je podmienené premnoženiu sa anaeróbnych baktérií, ktoré vytvárajú v ústach kyslé prostredie. Zmena pH orálnej dutiny podporuje vznik bakteriálnych biofilmov, ktoré následne vedú k vzniku zápalov v ľudských ústach [5].

Patogénne anaeróbne baktérie kolonizujúce orálnu dutiny zoradili Socransky a kol., (1998) do piatich mikrobiálnych komplexov podľa stupňa patogenity [6]. Vysokopatogénny potenciál majú baktérie, ktoré patria do tzv. červeného komplexu *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td) a *Tannerella forsythia* (Tf) spolu s baktériou *Aggregatibacter actinomycetemcomita*ns (Aa), ktorá je zaradená do samostatného mikrobiálneho komplexu. Podľa odbornej literatúry, uvedené baktérie sú schopné ovplyvniť imunitnú odpoveď hostiteľa, a tým vyvolať dysbiózu ústnej dutiny v dôsledku šírenia svojich patogénnych toxínov alebo sekundárnych mikrobiálnych produktov do krvného obehu. Baktérie *Prevotella intermedia* (*Pi*), *Parvimonas micra* (*Pm*) a *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) vykazujú stredný patogénny potenciál a boli zaradené do oranžového komplexu. Baktérie vykazujúce mierny patogénny potenciál sú zaradené do oranžového združeného komplexu. Do uvedeného komplexu patria baktérie *Campylobacter rectus* (*Cr*) a *Eubacterium nodatum* (*En*), ktoré sú známe ako prví kolonizátori ústnej dutiny a tvoria základ pre rast ďalších baktérií. Baktérie prítomné v ústnej dutine s nízkym patogénnym potenciálom sú *Capnocytophaga gingivalis (Cg)* a *Eikenella corrodens (Ec),* ktoré patria do tzv. zeleného komplexu [7].

Nadmerná prítomnosť anaeróbnych baktérií v ústach je asociovaná so vznikom ochorení ako napr. parodontitídy, rakoviny ústnej dutiny či s progresiou rakoviny pečene a pankreasu [5].

Okrem bakteriálnej kolonizácií, plní kľúčovú funkciu pri udržiavaní rovnováhy orálnej mikrobioty aj samotná imunitná reakcia hostiteľa. Práve v dôsledku prítomnosti patogénov je imunitná reakcia stimulovaná a dochádza k produkcii rôznych prozápalových cytokínov ako sú napr. interleukíny IL1, IL6, IL23, IL8 alebo tumor nektorický faktor alfa (TNFA), spolu so zápalovými biomarkermi nachádzajúcimi sa v slinách (napr. CXCL10, CRP, Alfa-amyláza, Ngal) [7; 8]. Tieto molekuly plnia rozhodujúcu funkciu pri progresii akútneho a chronického zápalu, čo môže viesť k nástupu systémových ochorení [7].

V slovenskej populácii doposiaľ nebola vykonaná štúdia, ktorá by sledovala asociáciu zloženia orálneho mikrobiómu a vplyvu fajčenia. Analýza orálneho mikrobiómu pomocou sekvenovania génu pre 16S rRNA zo vzoriek slín pochádzajúcich zo skupiny nefajčiarov a fajčiarov v rámci slovenskej populácie do 25 rokov, by pomohla identifikovať prítomnosť rizikových baktérií. Zároveň identifikácia zápalových markerov by mohla prispieť k sledovaniu zdravotného stavu ústnej dutiny a systémového zdravia uvedenej vzorky jedincov v slovenskej populácii.

V druhej fáze štúdie, by sme sa chceli sústrediť na objasnenie korelácie medzi baktériou *Lactobacillus reuteri,* užívaním polyfenolu a ich spoločným pôsobením na orálny mikrobióm fajčiarov. Štúdiom uvedeného vplyvu *L. reuteri* a polyfenolu by bolo možné následne navrhnúť preventívne a terapeutické stratégie, ktoré by viedli k zmierneniu negatívnych dôsledkov fajčenia, či už na samotnú ústnu dutinu, ako aj na systémové zdravie jedincov.

2 Materiál a metódy

V tejto časti si bližšie opíšeme použitý materiál vo výskume, ako aj metódy, ktoré boli potrebné pri vypracovávaní.

2.1 Odber vzoriek

Materiál zahrnutý do predloženej štúdie predstavoval vzorky slín odobratých od 108 jedincov vo vekovom

rozmedzí 18-25 rokov v rámci slovenskej populácie. Odber jednotlivých vzoriek bol vykonaný prostredníctvom odberu bukálneho steru po dobu 1 minúty pomocou odberovej paličky. Odber bol vykonaný nezávisle od pohlavia jedinca. Po odbere vzorky, zúčastnení jednotlivci vyplnili anonymný dotazník a informovaný súhlas ohľadom spracovania ich biologickej vzorky, ako aj ich osobných údajov. Uvedený dotazník pozostával z otázok ohľadom frekvencie fajčenia/nefajčenia, frekvencie denného ústneho hygienického rituálu a používania ústnej vody. V druhej časti bol dotazník zameraný na zdravotný stav jedincov, konkrétne či daný jedinec trpí alergiami, zubnými kazmi, zápalmi ústnej dutiny, prípadne aká bola frekvencia výskytu laryngitídy a bronchitídy za posledný rok a či jedinec trpí problémami s trávením. Následne po odbere, boli vzorky slín uskladnené až do doby extrakcie DNA, pri teplote 4^{o}C.

2.2. Extrakcia DNA

Z jednotlivých odobraných vzoriek bude následne extrahovaná DNA komerčným kitom na izoláciu DNA. Koncentrácia vyextrahovanej DNA bude následne kvantifikovaná pomocou súpravy Qubit dsDNA HS Assay Kit a fluorometra Qubit (Thermo Fisher Scientific).

2.3. Analýza orálneho mikrobiómu a zápalových markerov

Analýza orálneho mikrobiómu bude prebiehať pomocou sekvenovania génov pre 16S rRNA, ktorá nezávisí od kultivácie baktérií. Prostredníctvom hmotnostnej spektrometrie budeme sledovať prítomnosť vybraných zápalových molekúl vo vzorkách odobraných jedincov. Následne bude vykonaná bioinformatická analýza získaných dát pomocou programu Geneious, a bioštatistická analýza dát v programovacom jazyku R.

3 Výsledky a diskusia

Do predloženej štúdie sa zapojilo 108 osôb vo veku od 18-25 rokov. Z celkového počtu jedincov sme vytvorili 2 skupiny: (I) skupina fajčiarov, ktorá predstavovala 54 jedincov fajčiacich rôzne tabakové výrobky a (II) kontrolnú skupinu 54 jedincov, ktorí nikdy nefajčili. Pred odberom vzorky bolo potrebné minimálne 1h nefajčiť a nekonzumovať žiadne potraviny či nápoje.

Celkový priemerný vek zúčastnených bol 22 rokov a nelíšil sa v rámci oboch pohlaví. Zo získaného súboru jedincov bolo 65% ženského pohlavia (n= 70) a 35% mužského pohlavia (n=38). Vyšší počet vzoriek pochádzajúcich od žien bol pozorovaný aj v štúdii vykonanej na populácii v USA [9]. Autori uvedenej štúdie zaznamenali 53,2 % vzoriek pochádzajúcich od žien v porovnaní so vzorkami pochádzajúcimi od mužov, a preto sa predpokladá, že práve u ženského pohlavia je zvýšený záujem o zdravie orálnej dutiny.

Tabuľka 1: Celkový počet analyzovaných vzoriek, početnosti v skupine fajčiarov a nefajčiarov, priemerný vek jedincov a pohlavná distribúcia

skupina	počet vzoriek	priemerný vek	počet žien	počet mužov
celý súbor	108	22	70 (65%)	38 (35%)
fajčiari	54	21	28 (52%)	26 (48%)
nefajčiari	54	22	42 (78%)	12 (22%)

V rámci sledovaných skupín fajčiarov a nefajčiarov sme mohli pozorovať rozdiel v pohlavnej distribúcií jedincov. V skupine fajčiarov sme pozorovali rovnomerné rozdelenie oboch pohlaví, zatiaľ čo v skupine nefajčiarov bolo 78% (n= 42) vzoriek pochádzajúcich od žien. Z celkového súboru vzoriek pochádzajúcich od mužov predstavujú muži fajčiari 70% (n=26). Na základe odbornej literatúry je miera fajčenia vyššia u mužov v mnohých krajinách. U žien je však vyššie riziko negatívnych účinkov toxických látok z fajčenia rovnakého počtu cigariet v porovnaní s mužmi [10].

Tabuľka 2: Frekvencia denného ústneho rituálu v rámci skupín fajčiarov a nefajčiarov

skupina	frekvencia denného ústneho rituálu		
	nízka	normálna	vysoká
celý súbor	58 (54%)	48 (44%)	2 (2%)
fajčiari	31 (57%)	22 (41%)	1 (2%)
nefajčiari	27 (50%)	26 (48%)	1 (2%)

Legenda: nízka frekvencia denného ústneho rituálu – umývanie zubov menej ako 3x denne, normálna frekvencia – 3x denne, vysoká frekvencia – viac ako 3x denne.

Skupina nefajčiarov dosahovala normálnu frekvenciu denného ústneho rituálu stanovenú zubnými lekármi u 48% (n=26) sledovaných jedincov, zatiaľ čo v skupine fajčiarov to bolo o 7% menej. V celkovom súbore vzoriek prevažovala nízka frekvencia denného ústneho rituálu, pričom túto frekvenciu uviedlo 54% (n= 57) analyzovaných subjektov. Iba 2% (n=2) v anonymnom dotazníku

uviedlo, že si zuby umýva viac ako 3x denne. Nedostatočná ústna hygiena je asociovaná so zvýšenou tvorbou zubného plaku, a tým aj ku kolonizácií orálnych patogénnych baktérií, ktoré vedú ku tvorbe gingivitídy, zápalov ústnej dutiny a v konečnom dôsledku k nástupu parodontitídy či vzniku zubných kazov. Podľa predložených výsledkov z anonymného dotazníku predpokladáme, že práve fajčiari s nízkym denným rituálom by mali byť náchylnejší na uvedené ochorenia, ako aj na vznik ďalších systémových zápalových ochorení. Uvedená skupina by rovnako mala mať zvýšené zápalové markery vo svojich vzorkách slín.

Tabuľka 3: Početnosť jedincov trpiacich rôznymi ochoreniami v rámci celého súboru sledovaných vzoriek a v skupine fajčiarov a nefajčiarov

	početnosť jedincov s ochorením		
ochorenie/skupina	**celý súbor**	**fajčiari**	**nefajčiari**
alergie	45 (45%)	24 (44%)	21 (39%)
halitóza	7 (6%)	2 (4%)	5 (9%)
zubný kaz	68 (63%)	32 (60%)	36 (67%)
gingivitída	18 (17%)	6 (11%)	12 (22%)
zápal ústnej dutiny	5 (5%)	3 (5%)	2 (4%)
suchosť úst	8 (7%)	3 (5%)	5 (9%)
laryngitída	59 (55%)	30 (55%)	28 (52%)
bronchitída	37 (34%)	18 (33%)	19 (35%)
tráviace problémy	33 (31%)	14 (26%)	19 (35%)
spolu	**108 (100%)**	**54 (100%)**	**54 (100%)**

Na základe odpovedí z dotazníka sme stanovili početnosti jedincov trpiacich na vybrané ochorenia v rámci celého súboru odobraných vzoriek, ako aj v skupinách fajčiarov a nefajčiarov. V skupine nefajčiarov sme pozorovali 67% (n=36) opýtaných, ktorí trpeli zubnými kazmi, zatiaľ čo v skupine fajčiarov to bolo o 6% menej. Všeobecne je v odborných štúdiách práve fajčenie asociované so zvýšeným rizikom zubného kazu. Avšak, niektoré štúdie popisujú antimikrobiálnu aktivitu nikotínu, ako hlavnú zložku cigariet, ktorá by mohla viesť k obmedzeniu kolonizácií zubov práve patogénnymi baktériami [11]. Pri systémových ochoreniach, ako laryngitída a bronchitída, sme nepozorovali rozdiel medzi jednotlivými skupinami analyzovaných subjektov. V skupine fajčiarov 44% (n=24) jedincov uviedlo, že trpia alergiami, zatiaľ čo v skupine nefajčiarov alergie to uviedlo 39% (n=21) subjektov.

Pre objasnenie týchto skutočností, ktoré vyplývajú z vyhodnotenia dotazníka je potrebné vykonať ešte kompletnú analýzu orálneho mikrobiómu ako aj zápalových markerov.

Záver

Doposiaľ nebola v slovenskej populácii vykonaná štúdia, ktorá by systematicky preskúmala vzťah medzi zložením orálneho mikrobiómu a vplyvom fajčenia. Predložená práca sumarizuje výsledky z anonymného dotazníka v rámci skupín fajčiarov a nefajčiarov zapojených do štúdie. V skupine nefajčiarov bola zaznamenaná vyššia frekvencia normálneho denného ústneho rituálu, avšak vyšší výskyt zubných kazov. Na základe anonymného dotazníka, sme nepozorovali významné rozdiely pri ochoreniach ako laryngitída a bronchitída, kde sme predpokladali vyššiu chorobnosť v skupine fajčiarov.

Komplexná analýza orálneho mikrobiómu prostredníctvom sekvenovania génov pre 16S rRNA by nám umožnila porovnať jednotlivé mikrobiómy a zároveň identifikovať prítomnosť rizikových baktérií, ktoré asociujú so vznikom rôznych ochorení. Identifikácia zápalových markerov by prispela k sledovaniu zdravotného stavu ústnej dutiny a zhodnoteniu celkového zdravia slovenskej populácie.

V druhej fáze tejto štúdie by sme sa zameriavali na objasnenie korelácie medzi baktériou *Lactobacillus reuteri,* užívaním polyfenolov a ich vplyvom na orálny mikrobióm fajčiarov. Vďaka tomu by sme následne mohli vypracovať preventívne a terapeutické stratégie, ktoré by prispeli k zmierneniu negatívnych dôsledkov fajčenia, nielen v ústnej dutine, ale aj v celkovom zdraví jednotlivcov.

Použitá literatúra

[1] CASELLI E. a kol. 2020. Defining the oral microbiome by whole- genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. BMC microbiology. 2020, roč. 20, č.1.

[2] ARWEILER, N.B – NETUSCHIL, L. 2016. The oral microbiota. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2016, č. 902, s. 45–60.

[3] NA, H. S. 2020. Identification of Potential Oral Microbial Biomarkers for the Diagnosis of Periodontitis. Journal of Clinal Medicine.2020, roč. 9. č. 5, s. 1549

[4] JIA, Y. J. 2021. Association Between Oral Microbiota and Cigarette Smoking in the Chinese Population. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2021, roč. 11.

[5] MAKI, K. A. 2022. The role of the oral microbiome in smoking-related cardiovascular risk: a review of the

literature exploring mechanisms and pathways. Journal of Translational Medicine 2022. 2022, roč. 20, č. 1, s. 1–26

[6] SOCRANSKY, S. S. a kol. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. In Journal of Clinical Periodontology, roč. 25 č. 2, s. 134–144.

[7] XU, W. a kol. 2020. Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis. In Advances in protein chemistry and structural biology. roč. 120, s. 45–84.

[8] DONATO K. a kol. 2023. Exploring the Impact of Tobacco Usage on Microbiome Dysbiosis and Associated Health Risks: A Comprehensive Review of Recent Advancements and Future Directions. Clinical Therapeutics. roč. 2, č. 6, s.119-125

[9] EKE, P. a kol. 2016. Periodontitis prevalence in adults ≥ 65 years of age, in the USA. In Periodontology 2000. roč. 72, č. 1.

[10] PETERS S.A. 2014. Do smoking habits differ between women and men in contemporary Western populations? Evidence from half a million people in the UK Biobank study. roč.4. č.12

[11] ROOBAM T. 2011. Tooth decay in alcohol and tobacco abusers. Journal of oral maxillofacial pathologies. roč. 15, č.1, s.14-21

Vplyv maturačného média na vývinový potenciál oocytov a kvalitu embryí produkovaných *in vitro*

The impact of maturation medium on the developmental competence of oocytes and the quality of embryos *in vitro*

Dominika Martinčeková[1], Alexandra Rosenbaum Bartková[2,3]
Školiteľ: František Strejček[4]
[1,4] Katedra botaniky a genetiky, FPVaI UKF, Nábrežie mládeže 91, 949 01 Nitra,
[2]Katedra zoológie a antropológie, FPVaI UKF, Nábrežie mládeže 91, 949 01 Nitra,
[3] Ústav živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd ČR, Rumburská 89, 277 21 Liběchov, Česká republika
[1] dominika.martincekova@ukf.sk, [2,3] arbartkova@ukf.sk, [4]fstrejcek@ukf.sk

Abstrakt

Produkcia kvalitných embryí v *in vitro* prostredí v súčasnosti nedosahuje úroveň, ktorá by bola porovnateľná s produkciou v *in vivo*. Preto sa súčasný výskum zameriava na faktory, ktoré podporujú vývinovú kompetenciu oocytov už počas ich dozrievania v rámci metód *in vitro* maturácie (IVM), ktorá predstavuje prvý krok pri produkcii zrelých a oplodnenia schopných oocytov. Jedným z významných faktorov, ktoré ovplyvňujú IVM oocytov a získavanie vývinovej kompetencie je práve maturačné médium. Doplnením vhodných suplementov do maturačného média a jeho optimalizáciou je možné zvýšiť vývinový potenciál oocytov, ktorý sa prejaví počas úspešného oplodnenia a embryogenézy. Naša štúdia sa preto zameriava na vplyv optimalizovaného maturačného média FLI na vývinový potenciál oocytov izolovaných z malých a veľkých folikulov (SF 1-2 mm vs. LF 3-6 mm) a na kvalitu výsledných embryí.

Kľúčové slová: maturačné médium, oocyt, vývinový potenciál, kvalita embryí

Abstract

The production of high quality embryos in the *in vitro* environment currently does not reach a level comparable to *in vivo* production. Therefore, current research focuses on factors that support the developmental competence of oocytes even during their maturation within *in vitro* maturation (IVM) methods, which represent the first step in producing mature and fertilisation-capable oocytes. One of the significant factors influencing the IVM of oocytes and the acquisition of developmental competence is maturation medium. By supplementing suitable supplements into the maturation medium and optimizing it, it is possible to enhance the developmental potential of oocytes, which is demonstrated during successful fertilisation and embryogenesis. Therefore, our study focuses on the impact of the optimized maturation medium FLI on the developmental potential of oocytes isolated from small and large follicles (SF 1-2 mm vs LF 3-6 mm) and on the quality of resulting embryos.

Key Words: maturation medium, oocyte, developmental potential, embryonal quality

Úvod

V dnešnej dobe je spoločensky vyvíjaný tlak na páry v reprodukčnom veku či už z hľadiska stúpajúcich nárokov na kariérny rozvoj alebo súčasných zmien v spôsobe života. Mnoho párov je tak nútených zakladať si rodiny vo vyššom veku, v dôsledku čoho sa znižuje kvalita ich pohlavných buniek a objavuje sa problém s prirodzeným počatím. Njagi *et al.* (2023) uvádzajú, že v súčasnosti neplodnosť postihuje 12,6-17,5% dospelej populácie. Záujem o služby reprodukčnej medicíny preto intenzívne narastá. Aj napriek tomu, že pozorujeme stále narastajúcu mieru neplodnosti, pokroky v službách asistovanej reprodukcie (ART) ponúkajú možnosť úspešného oplodnenia v *in vitro* podmienkach (IVF) [2, 3]. Úspešnosť jednotlivých metodík však nie je dostatočná, a preto sa v súčasnosti výskum zameriava najmä na optimalizáciu protokolov a metodík orientovaných na úspešnosť *in vitro* maturácie (IVM) a *in vitro* produkcie embryí (IVP) [4].

Pre našu štúdiu sme vybrali ošípanú ako vhodný modelový organizmus kvôli jej vysokej podobnosti v anatómii a fyziológii s človekom [5]. Našim cieľom bolo sledovať vplyv optimalizovaného maturačného média FLI ako jedného z hlavných faktorov vplývajúci

na vývinovú kompetenciu oocytov, úspešnosť produkcie embryí a kvalitu výsledných embryí produkovaných *in vitro.*

1 Vývinový potenciál oocytov

Vývinová kompetencia oocytov je jeden z najdôležitejších faktorov, ktoré ovplyvňujú schopnosť samičej gaméty dozrieť, podstúpiť oplodnenie a udržať embryonálny vývin do štádia blastocysty [6]. Oocyt, ktorý je vývinovo kompetentný je schopný:

- dokončiť jadrové dozrievanie a to vytvorením deliaceho vretienka a správnym usporiadaním chromozómov;
- dokončiť cytoplazmatické dozrievanie vrátane rozsiahlej remodelácie organel a biogenézy maternálnej RNA;
- vytvoriť epigenetický profil, ktorým budú ovplyvnené deje pred aktiváciou embryonálneho genómu;
- riadiť organizáciu špecializovanej cytoplazmatickej mriežky, ktorá pomáha pri ukladaní maternálnej RNA a dôležitých translačných udalostí RNA potrebných na syntézu proteínov [7].

V laboratórnych podmienkach oocyt nadobúda vývinovú kompetenciu vďaka IVM, ktorej snahou je napodobniť prirodzené prostredie vaječníkov. Úspešnosť IVM ovlyvňuje viacero faktorov a jedným z nich je zloženie maturačného média, ktoré je druhovo špecifické a zvyčajne doplnené suplementami ako antioxidanty, hormóny, rastové faktory a pod. [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

1.1 Partenogenetická aktivácia oocytov

V *in vitro* podmienkach je možné aktivovať zrelé (MII) vysoko kvalitné oocyty využitím partenogenetickej aktivácie, za pomoci externých stimulov, v dôsledku ktorej je zahájená raná embryogenéza. V prípade chemickej aktivácie je oocyt aktivovaný vďaka zvýšenej koncentrácii Ca^{2+} v ooplazme, čím dochádza k zníženiu maturation promoting factor (MPF) a k aktivácii oocytu. Ako externé stimuly sa najčastejšie využívajú chemikálie ako ionomycín, stroncium a etanol. V prípade elektrickej aktivácie sa využíva elektrický impulz, ktorý spôsobí prítok extracelulárneho Ca^{2+} v dôsledku čoho sa zvýšia intracelulárne katióny vápnika. Dokončí sa druhé meiotické delenie, čoho znakom je vylúčenie PBII a začína vývin embrya [15, 16, 17].

2. Materiál a metodika

Všetky použité média boli vopred pripravené, prefiltrované pomocou 0,22 µm membránového filtra Whatman a pred použitím vyhriate na 38,5°C. Použité médiá vrátane doplnkov boli zakúpené od spoločnosti Sigma Chemical Co., AppliChem, ak neuvádzame inak.

2.1 Izolácia a selekcia COCs

Odber vaječníkov bol vykonaný na bitúnku Příbram, ČR po usmrtení prepubertálnych ošípaných. Transport prebiehal v termoboxe s udržiavanou teplotou 37°C.

Na pracovisku ÚŽFG AV ČR boli vaječníky premyté fyziologickým roztokom vyhriatym na 37,5°C. Aspirácia malých folikulov (SF, 1-2 mm) a veľkých folikulov (LF, 3-6 mm) prebiehala pomocou ihly a injekčnej striekačky.

Po odbere bol sediment z folikulárnej tekutiny premytí médiom PXM-Hepes vyhriatym na 37,5°C. COCs sme vyhľadávali pod stereolupou (Zeiss, Stemi 508). Selekcia prebiehala na základe morfologického hodnotenia kvality COCs tzn. 3-5 vrstiev kumulárnych buniek, neporušená *zona pellucida*, číra homogénna ooplazma.

2.3 *In vitro* maturácia COCs

Vyselektované COCs sme rozdelili do experimentálnych skupín SF (1 - 2 mm) a LF (3 - 6 mm), pričom v každej experimentálnej skupine sa nachádzalo 30 COCs najvyššej morfologickej kvality.

Experimentálne skupiny boli vytvorené za účelom pozorovania vplyvu optimalizovaného (FLI) maturačného média, pričom sa hodnotila úspešnosť IVM a partenogenetickej aktivácie. Ako kontrola nám slúžilo štandarné médium TCM199. Pred samotnou IVM sme nechali vybrané maturačné médiá ekvilibrovať min. 1h v inkubátore. Následne boli jednotlivé skupiny dvakrát premyté v maturačnom médiu a umiestnené do 500 µl maturačného média TCM-199 (Tab. 1) a maturačného média FLI (doplnené o cytokíny IGF1, FGF2, LIF) (Tab. 2). IVM oocytov prebiehala 44h pri inkubačných podmienkach 5% CO_2 a 38,5°C.

Tab. 1: Zloženie maturačného média TCM-199 s hormónmi a rastovými faktormi

Maturačné médium TCM-199	**2 ml**
TCM-199 pracovný stock	2 ml
EGF	10 ng/ml
PMSG	10 IU/ml
HCG	10 IU/ml

Tab. 2: Zloženie maturačného média FLI-final doplneného o cytokíny

FLI-final	Koncentrácia	2ml
TCM-199	-	2 ml
EGF	10 ng/ml	1 µl
FGF2	40 ng/ml	1,6 µl
IGF1	20 ng/ml	0,8 µl
LIF	-	4 µl
L-cysteín	0,57 nM	10 µl
PMSG	10 IU/ml	8 µl
HCG	10 IU/ml	6 µl

2.4 Detekcia *in vitro* maturácie

IVM sme detegovali po 44h. Po mechanickom odstránení kumulárnych buniek sme oocyty fixovali na podložnom sklíčku 24h v kyseline octovej a 96% etanole (1:3). Po 24h sa preparáty zafarbili 1% aceto-orceínom. Úspešnosť IVM s cieľom detekcie MII bola vykonaná pod mikroskopom s fázovým kontrastom (Laurinčík *et al.* 2004).

2.5 Partenogenetická aktivácia

Po 44h IVM nasledovalo mechanické odstránenie kumulárnych buniek a dvojitý premyv v predhriatom PXM-Hepes médiu. Partenogenetická aktivácia oocytov prebiehala v PXM-Hepes s 10 µM ionomycínu (IO) po dobu 5 min pri RT.

Po aktivácii sme pokračovali trojitým premyvom v 500 µl porcine zygote medium 3 (PZM3) [19] doplnenom o 2 mM 6- dimethylaminopurine (6-DMAP) a následnou 5h inkubáciou v inkubátore (5% CO_2; 38,5°C).

Po 5h nasledoval dvojitý premyv v 500 µl PZM3- final a 7-dňová kultivácia v inkubátore (5% CO_2; 38,5°C).

2.6 Značenie jadier blastocýst

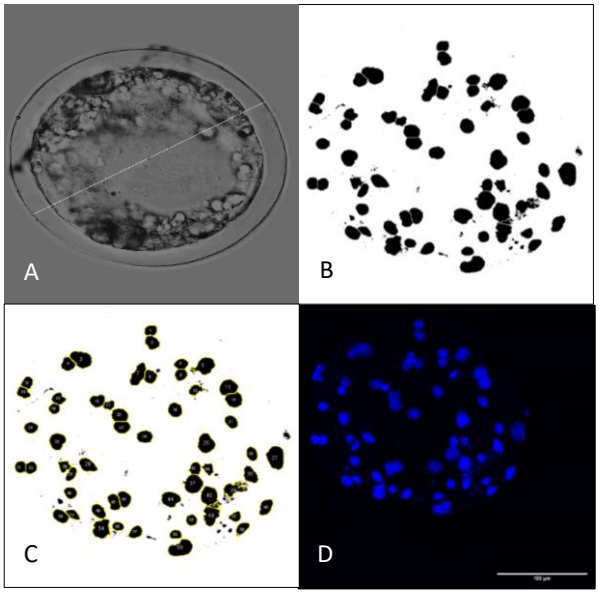
Po 7 dňoch IVC embryí sme získali blastocysty, ktoré sme dvojnásobne premyli v PBS + 2% BSA a zafixovali v 500 µl 4% paraformaldehydu na 40 min RT.

Nasledoval trojitý oplach fixovaných blastocýst v PBS + 2% BSA a permeabilizácia *zona pellucida* v 100 µl Triton X-100 po dobu 90 min RT. Blastocysty sme trikrát premyli v PBS + 2% BSA a preniesli na podložné sklíčko (Thermo Scientific) s malým množstvom média. Blastocysty sme zakvapli 10 µl montovacieho média s DAPI (Vectashield Vibrance) a nechali stuhnúť v chladničke min. 12h. Zafixované sklíčka sme neskôr pozorovali pod konfokálnym mikroskopom (Leica SP5).

2.7 Analýza snímkov z konfokálnej mikroskopie

Na stanovenie priemerov blastocýst a počtu jadier v blastocystách sme využili program FIJI (ImageJ). Priemery blastocýst v jednotlivých experimentálnych skupinách boli merané pomocou nástroja „straight lines".

Počet jadier v blastocystách sme stanovili po vytvorení Z-stack snímky, nastavení optimálneho tresholdu a s využitím funkcie „analyse particles" (Obr.1).



Obr. 1 Analýza snímkov z konfokálnej mikroskopie: (A) hodnotenie veľkosti blastocýst; (B-D) počet jadier

3. Výsledky a diskusia

Štatistická analýza dát bola hodnotená ANOVOU s Tukeyho post testom (SigmaPlot 12.0, Londýn, UK) a odchýlkou signifikantnosti $p < 0,05$. Každý experiment bol opakovaný štyrikrát.

3.1 Hodnotenie IVM a IVP embryí

Dosiahnutie MII fázy sme v našich laboratórnych podmienkach pozorovali v skupine SF-TCM V 42,5% a v SF-FLI v 80,8%. V skupine oocytov z LF sme sledovali MII fázu LF-TCM v 51,6% a v LF-FLI v 91,6% (Tab. 3). Signifikantné rozdiely boli detegované vo všetkých experimentálnych skupinách s výnimkou SF-FLI vs. LF-TCM.

Tab. 3: Úspešnosť IVM oocytov

Experimentálna skupina	Celkový počet oocytov	Počet oocytov v MII (%)
SF-TCM	120	51 (42,5%)
LF-TCM	120	62 (51,6 %)
SF-FLI	120	97 (80,8%)
LF-FLI	120	110 (91,6%)

V rámci hodnotenia embryogenézy sme v skupine SF-TCM sledovali delivosť embryí v 50,9% a podiel blastocýst 18,02%. V skupine SF-FLI sme zaznamenali delivosť v 73 % a podiel blastocýst 37,5%. V LF-TCM sledovali delivosť embryí v 71%, pričom podiel blastocýst 36,5%. V skupine LF-FLI sme zaznamenali delivosť v 91% a podiel blastocýst v 43,2%. Signifikantné rozdiely sme zaznamenali opäť vo všetkých experimentálnych skupinách s výnimkou SF-FLI vs. LF-TCM (Tab. 4).

Tab. 4: Delivosť embryí a podiel blastocýst

Experimentálna skupina	Delivosť	Podiel blastocýst
SF-TCM	61 (50,9%)	11 (18,03%)
LF-TCM	85 (71%)	31 (36,5%)
SF-FLI	88 (73%)	33 (37,5%)
LF-FLI	109 (91%)	47 (43,2%)

Zhodnotením priemeru a počtu jadier blastocýst sme v exprimentálnej skupine SF-TCM zaznamenali priemernú veľkosť blastocýst 117,47 µm s počtom jadier 37,9. V rámci skupiny SF-FLI sme pozorovali veľkosť blastocýst 155,36 µm s počtom jadier 57,1.

V LF-TCM blastocysty dosahovali priemernú veľkosť 161,95 µm, pričom počet jadier bol 59,4. V skupine LF-FLI priemerná veľkosť blastocýst dosahovala 181,48 µm s počtom jadier 66,1 (Tab. 5).

Tab. 5: Hodnotenie priemernej veľkosti blastocýst a počtu jadier

Experimentálna skupina	Priemer blastocýst (µm)	Počet jadier blastocýst
SF-TCM	117,47 µm	37,9
LF-TCM	161,95 µm	59,4
SF-FLI	155,36 µm	57,1
LF-FLI	181,48 µm	66,1

V rámci hodnotenia úspešnosti IVM Gad *et al.* (2019) zaznamenali v skupine oocytov pochádzajúcich z SF a maturovaných v médiu TCM-199 rovnako ako aj my pokles oocytov v MII fáze (42,5% vs. 51,73%). Naše výsledky zo skupiny SF-FLI korelujú s Dutta *et al.* (2016), ktorí použili oocyty izolované z veľkých folikulov maturované v štandardne používanom médiu (80,8% vs. 79,9%). Toto zistenie vyzdvihuje efektivitu optimalizovaného maturačného média FLI, ktoré má priaznivé účinky najmä na získavanie vývinovej kompetencie oocytov zo skupiny SF, ktoré sú považované za menej kompetentné. V skupine oocytov z LF v médiu TCM-199 sme rovnako ako Procházka *et al.* (2021) zaznamenali nižšiu úspešnosť IVM (69,9% vs. 51,6%). V skupine oocytov z LF-FLI sme pozorovali koreláciu výsledkov s Yuan *et al.* (2017), ktorí dosiahli úspešnosť IVM (91,6% vs. 89%).

V druhej časti našich experimentov (úspešnosť IVP) sme pozorovali v experimentálnej skupine SF-TCM delivosť 50,9% s podielom blastocýst 18,02%. V rámci skupiny LF-TCM výsledky zo štúdie Procházka *et al.*(2011) dosiahli vyššiu delivosť embryí v porovnaní s našimi výsledkami (88,8% vs. 71%), hoci pri porovnaní podielu blastocýst sme v našich experimentoch dosiahli vyššiu úspešnosť (22,25% vs. 36,5%). Pri porovnaní výsledkov LF-FLI s Gad *et al.* (2020) možno povedať, že sme detekovali vyššiu delivosť (91% vs. 82,15%) a podiel blastocýst (43,2% vs. 28,12%). V skupine oocytov z SF-FLI sú naše výsledky porovnateľné s kontrolnou skupinou v štúdii Bartkova *et al.* (2020), ktorí sledovali úspešnosť partenogenetickej aktivácie v skupine oocytov LF maturovaných v DMEM médiu (79,83% vs.73%).

V poslednej experimentálnej časti sme sa venovali stanoveniu priemerov blastocýst a počtu jadier. Podľa Shapiro *et al*. (2008) môže priemer blastocysty slúžiť ako užitočný indikátor vývinového potenciálu oocytu. Je možné predpokladať, že väčší priemer blastocýst môže zvýšiť šancu úspešnej implantácie. Na základe našich výsledkov z experimentálnej skupiny SF-TCM možno povedať, že sme pozorovali priemernú veľkosť blastocýst; 117,47 µm s priemerným počtom jadier 37,9. Podobný počet jadier (40 vs. 37,9) zaznamenali aj Kidson *et al.* (2004), hoci v svojej štúdii v rámci IVF dosiahli priemernú veľkosť blastocýst 174,1 µm. IVF využili aj Yamashita *et al.* (2020), ktorí zaznamenali priemernú veľkosť blastocýst 178,9 µm. Tieto výsledky korelujú s našimi pozorovaniami v experimentálnej skupine LF-FLI (181,48 µm). Hao *et al.* (2006) sledovali priemery blastocýst v intervale <150 a >180 µm s využitím partenogenetickej aktivácie, pričom ich

dolná hranica priemeru zodpovedá SF-FLI (155,36 µm) pričom počet jadier v danej priemerovej hranici bol v porovnaní s našími výsledkami nižší (29,7 vs. 57,1).

Záver

Vývinový potenciál oocytov je nevyhnutný pre úspešnú produkciu embryí *in vitro*. Preto sme sa v našej práci rozhodli sledovať vplyv vybraných maturačných médií (TCM-199 vs. FLI) na stanovenie úspešnosti produkcie embryí a kvalitu blastocýst na základe stanovenia ich veľkosti a počtu jadier.

Z našich výsledkov vyplýva, že maturačné médium FLI signifikantne vplýva nie len na vývinový potenciál oocytov, ale aj na ranú embryogenézu. Efektivitu média FLI je možné pozorovať najmä v skupine oocytov z malých folikulov, ktoré v porovnaní s kontrolnou skupinou nevykazujú signifikantné rozdiely. Výsledky tejto štúdie tak prestavujú základ pre ďalší výskum *in vitro* maturácie oocytov s možnosťou využitia v biotechnológiách živočíchov resp. humánnej medicíne.

Poďakovanie

Touto cestou sa chcem poďakovať RNDr. Alexandre Rosenbaum Bartkovej, PhD. MBA za cenné rady, ktoré mi vždy ochotne poskytla a za sprostredkovanie stáže na zahraničnom pracovisku, ÚŽFG AV ČR v Liběchove, v rámci ktorej boli získané výsledky tejto práce.

Táto práca bola realizovaná s finančnou podporou projektu KEGA 041UKF-4/2024, ERASMUS+.

Použitá literatúra

[1] NJAGI, Purity. *et al*. 2023. Financial costs of assisted reproductive technology for patients in low – and middle – income countries: a systematic review. *In Human Reproduction Open*. 2023, vol. 2023, no. 2, hoad007.

[2] KUSHNIR, Vitaly A. – SMITH, Gary D. – ADASHI, Eli Y. 2022. The Future of IVF: The New Normal in Human Reproduction. *In Reprod Sci.* 2022, vol. 29, no. 3, pp. 849-856.

[3] LAFONTAINE, Simon *et al*. 2023. Comparison of cattle derived from *in vitro* fertilization, multiple ovulation embryo transfer, and artificial insemination for milk production and fertility traits. *In Journal of Dairy Science*, 2023, vol. 106, no 6, pp. 4380-4396.

[4] JIANG, Yao *et al.* 2023. Advances in Oocyte Maturation *In Vivo* and *In Vitro* in Mammals. *In Int J Mol Sci.* 2023, vol. 24, no. 10, pp. 9059.

[5] LUNNEY, Joan K., *et al.* 2021. Importance of pigs as a human biomedical model. *In Sci. Transl. Med.* 2021, vol. 13, pp. eabd5758.s

[6] SIRAIT, Batara *et al.,* 2021. Oocyte Competence Biomarkers Associated With Oocyte Maturation: A Review. *In Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021, vol. 9, pp. 710292.

[7] XU, Jing - ZELINSKI, Mary B. 2022. Oocyte quality following in vitro follicle development. *In Biology of Reproduction.* 2022, vol. 106, no. 2, pp. 291–315.

[8] BISWAS, Dibyendu *et al.* 2024. Epigen enhances the developmental potential of in vitro fertilized embryos by improving cytoplasmic maturation. In Theriogenology. 2024, vol. 218, pp. 16–25.

[9] JIANG, Yao *et al.* 2023. Advances in Oocyte Maturation In Vivo and In Vitro in Mammals. *In International Journal of Molecular Sciences.* 2023, vol. 24, no. 10, pp. 9059.

[10] YAO, Minhua *et al.* 2023. Establishment and optimization of an in vitro guinea pig oocyte maturation system. *In PLOS ONE*. 2023, vol. 18, no. 4, e0285016.

[11] BAISHYA, Dipannita *et al*. 2020. Effect of fetal bovine serum on *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *In Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2020, vol. 8, no. 5, pp. 2187–2191.

[12] CARRILLO-GONZÁLEZ, Diego F. *et al*. 2020. L-Carnitine Supplementation during *In Vitro* Maturation and *In Vitro* Culture Does not Affect the Survival Rates after Vitrification and Warming but Alters Inf-T and ptgs2 Gene Expression. *In International Journal of Molecular Sciences*. 2020, vol. 21, no. 16, pp. 5601.

[13] SUOCHENG, Wei *et al*. 2017. Maturation rates of oocytes and levels of FSHR, LHR and GnRHR of COCs response to FSH concentrations in IVM media for sheep. *In Journal of Applied Biomedicine*. 2017, vol. 15, no. 3, pp. 180–186.

[14] PROCHÁZKA, Radek *et al*. 2011. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence in vitro: comparison with gonadotropins. *In Reproduction*. 2011, vol. 141, no. 4, pp. 425–435.

[15] PAFFONI, Alessio *et al.,* 2008. Parthenogenetic Activation: Biology and Applications in the ART Laboratory. *In Placenta*. 2008, vol. 29, pp. 121–125.

[16] KHARCHE, Suresh Dinkar - BIRADE, Hemant Shankar, 2013. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for *in vitro* embryo production:

A review. *In Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2013, vol. 4, no. 2, pp. 170–182.

[17] KOUAMO, Justin - KHARCHE, Suresh Dinkar. 2015. A comparative study of parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization of *in vitro* matured caprine oocytes. *In Iranian Journal of Veterinary Research*. 2015, vol. 16, no. 1, pp. 20–24.

[18] LAURINČÍK, Jozef *et al.* 2004. Biotechnológie živočíchov. Nitra: UKF, 2004, 172 p. ISBN 80-8050-860-7.

[19] YOSHIOKA, Koji *et al.* 2002. Birth of Piglets Derived from Porcine Zygotes Cultured in a Chemically Defined Medium. *In Biology of Reproduction*. 2002, vol. 66, no 1, pp. 112–119.

[20] GAD, Ahmed *et al.* 2019. MicroRNA expression profile in porcine oocytes with different developmental competence derived from large anf small follicles. I*n Molecular reproduction and development. 2019,* vol. 86, no. 4, pp. 426-439

[21] DUTTA, Rahul *et al.* 2016. Non-invasive assessment of porcine oocyte quality by supravital staining of cumulus-oocyte complexes with lissamine green B. *In Zygote*. 2016, vol. 24, no. 3, pp. 418-27.

[22] PROCHÁZKA, Radek *et al.* 2021. The Role of MAPK3/1 and AKT in the Acquisition of High Meiotic and Developmental Competence of Porcine Oocytes Cultured *In Vitro* in FLI Medium. *In International journal of molecular sciences*. 2021, vol. 22, no. 20, pp. 11148.

[23] YUAN, Ye *et al.* 2017. Quadrupling efficiency in production of genetically modified pigs through improved oocyte maturation. *In Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017, vol. 114, no. 29, E5796-E5804.

[24] PROCHÁZKA, Radek *et al.* 2011. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence *in vitro*: comparison with gonadotropins. *In Reproduction*. 2011, vol. 141, no. 4, pp. 425-435.

[25] GAD, Ahmed *et al.* 2020. Inhibition of miR-152 during *In Vitro* Maturation Enhances the Developmental Potential of Porcine Embryos. *In Animals (Basel).* 2020, vol. 10, no. 12, pp. 2289.

[26] BARTKOVA, Alexandra *et al.* 2020. Characterization of porcine oocytes stained with Lissamine Green B and their developmental potential *in vitro*. *In Animal Reproduction.* 2020, vol. 17, no. 4, e20200533.

[27] SHAPIRO, Bruce S. *et al.* 2008. Large blastocyst diameter, early blastulation, and low preovulatory serum progesterone are dominant predictors of clinical pregnancy in fresh autologous cycles. *In Fertility and Sterility*. 2008, vol. 90, no. 2, pp. 302-309.

[28] KIDSON, A. *et al.* 2004. Quality of porcine blastocysts produced *in vitro* in the presence or absence of GH. *In Reproduction*. 2004, vol. 127, no. 2, pp 165-77.

[29] YAMASHITA, Shiro *et al.* 2020. Suppression of mosaic mutation by co-delivery of CRISPR associated protein 9 and three-prime repair exonuclease 2 into porcine zygotes via electroporation. *In Journal of Reproduction and Developmen*t. 2020, vol. 66, no. 1, pp. 41-48.

[30] HAO, Yan-Hong *et al.* 2006. Developmental competence of porcine parthenogenetic embryos relative to embryonic chromosomal abnormalities. *In Molecular Reproduction and Development*. 2006, vol. 73, no. 1, pp 77–82.

Biopesticídne zlúčeniny rodu *Tagetes* a ich produkcia v *in vitro* kultivačných systémoch

Biopesticide compounds of genus *Tagetes* and their production in *in vitro* cultivation systems

Patrik Mihala[1] – Ján Kraic[1,2]
Školiteľ: Ján Kraic[1,2]
[1]Ústav biológie a biotechnológie, FPV UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
[2]Výskumný ústav rastlinnej výroby, NPPC, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany
[1] mihala1@ucm.sk, [1,2]jan.kraic@ucm.sk

Abstrakt
Aksamietnice (*Tagetes* spp.), z čeľade *Astraceae*, sú liečivé, okrasné aj úžitkové rastliny s obsahom zaujímavých biologicky aktívnych látok. Rôzne druhy *Tagetes* sú používané v poľnohospodárstve na účinnú kontrolu populácie škodcov. Biopesticídne účinky majú vďaka obsahu sírnych zlúčenín – tiofénov. Ich aktivita spočíva v odpudzovaní hmyzu a nematód z prostredia v ktorom rastú, uvoľňovaním prchavých látok, alebo škodcov priamo usmrcujú pri dlhej expozícii. Z ekonomického a ekologického hľadiska je vhodné produkovať biomasu alebo metabolity aksamietnic v *in vitro* kontrolovaných podmienkach pre optimalizáciu výroby. Najjednoduchším spôsobom kultivácie rastlinnej biomasy sú kalusové a bunkové kultúry. Vyššia produkcia tiofénov však bola zaznamenaná v hairy-roots kultúrach, nakoľko sú tiofény akumulované v koreňovom systéme rastlín. Takto produkované metabolity sú základom pre komerčné využitie biopesticídov z *Tagetes* spp.
Kľúčové slová: biopesticídy, *in vitro*, sekundárne metabolity, *Tagetes* spp., tiofény.

Abstract
Marigolds (*Tagetes* spp.) from the family *Astraceae* are medicinal, ornamental, and useful plants containing interesting biologically active substances. Various species of *Tagetes* are used in agriculture to effectively control pest populations. They have biopesticide effects thanks to the content of sulfuric compounds - thiophenes. Their activity lies in repelling insects and nematodes from the environment in which they grow, releasing volatile substances or directly killing pests after long exposure. From an economic and ecological point of view, it is convenient to produce biomass or metabolites of marigold plants in controlled *in vitro* conditions for optimalization of production. Callus and cell cultures are the simplest way of cultivating plant biomass. However, a higher production of thiophenes was recorded in hairy-roots cultures, as thiophenes are accumulated in the root system of the plants. Metabolites produced in this way are the basis for the commercial use of biopesticides from *Tagetes* spp.
Key Words: biopesticides, *in vitro*, secondary metabolites, *Tagetes* spp., tiophenes.

Úvod
Rod aksamietnica (*Tagetes*) zahŕňa viac ako 55 bylinných druhov, ktoré pôvodom pochádzajú z Ameriky, predovšetkým z oblasti Mexika a Latinskej Ameriky [1]. Rod patrí do čeľade astrovité (*Astraceae*). V dnešnej dobe sa po celom svete pestujú rôzne druhy aksamietnice pre ich vzhľad ako okrasné rastliny v exteriéri aj interiéri. Obľúbené sú aj kvôli ich jednoduchému pestovaniu a dlhej perióde kvitnutia. Najvyužívanejšie druhy sú aksamietnica vzpriamená (*Tagetes erecta* L.), aksamietnica rozložitá (*Tagetes patula* L.), ako aj divoký druh aksamietnica menšia (*Tagetes minuta* L.), ktorá obsahuje množstvo využiteľných silíc. Vďaka veľkej variabilite týchto rastlín, ktorá sa odzrkadľuje v rôznom sfarbení ich kvetov sa využívajú extrakty kvetov aksamietnice ako doplnky stravy a prídavné farbiace látky v potravinárstve. Okvetné listy aksamietnic obsahujú karotenoidné pigmenty, najmä xantofyl luteín s obsahom až 88% v extraktoch kvetov [2]. Silice z listov a kvetov odlišných druhov aksamietnic sú podobné obsahom bioaktívnych látok. Silice obsahujú najmä dihydrotagetóny, tagetóny, ocimenóny a piperitón v rôznych pomeroch v závislosti od druhu. Najväčšie zastúpenie majú (Z)-ocimenón a (E)-ocimenón, piperitón, (E)-tagetón a terpinolén [3,4]. Z biotechnologického hľadiska sú sekendárne metabolity aksamietnice zaujímavé kvôli produkcii sírnych zlúčenín – tiofénov, ktoré majú insekticídne [5], nematocídne [6], antifungálne [7] a antibakteriálne účinky [8]. Potenciálne uplatnenie môžu nájsť tieto rastliny aj pri fytoremediácii

a akumulácii ťažkých kovov ako je chróm, meď, kadmium a olovo z pôdy [9]. V ľudovej medicíne sa využíva najmä aksamietnica vzpriamená, ktorá sa používa na liečbu mnohých ochorení. Nálev z tejto rastliny sa užíva pri reume, nádche a bronchitíde, ďalej sa užíva ako diuretikum, antihelmintikum, karminatívum a laxatívum [10].

1 Chemická charakterizácia

Ako všetky rastliny, aksamietnice produkujú veľké množstvo zlúčenín, ktoré potrebujú pre vývoj a rast – primárne metabolity a tiež zlúčeniny, ktoré rastliny chránia pred biotickým a abiotickým stresom – sekundárne metabolity. Sekundárne metabolity produkované rodom *Tagetes* možno zaradiť do niekoľkých skupín: flavonoidy, alkaloidy, tiofény, benzofurány [11] a terpény [12]. Chemická analýza silíc *T. patula* pomocou GC/MS odhalila celkovo 43 zlúčenín. Najviac zastúpenými zlúčeninami boli piperitenón (23,5%) a piperitón (20,1%), ďalej (Z)-tagetón (4,7%), (E)- tagetón (2,3%) a spatulenol (1,7%). V menšom zastúpení sa nachádzali (Z)-β-ocimén (1,1%) a dihydrotagetón (0,4%) [11]. Iné práce popísali celkovo obsah 46 zlúčenín v siliciach z listov a kvetov *T. erecta*. Zložky so zastúpením nad 1% boli piperitón limonén, (Z)-β-ocimén, terpinolén, (Z)-myroxid, α- terpineol, indol, piperitenón [13]. Z obsiahnutých zlúčenín v extraktoch druhov *Tagetes* sa biopesticídna aktivita pripisuje najmä tiofénom a [14,15] a benzofuránom [15,16].

1.1 Tiofény

Tiofény sú heterocyklické zlúčeniny s päťčlánkovým cyklom, ktorý obsahuje atóm síry. Boli identifikované celkovo štyri tiofénové zlúčeniny s rôznym pomerovým zastúpením v koreňoch výhonkoch a kvetoch druhov *Tagetes*. Sú to zlúčeniny 5-(4-hydroxy-1-butenyl)-2,2'-bitienyl [BBTOH]; 5-(4-acetoxy-1-butenyl)-2,2'-bitienyl [BBTOAC]; 5-(3-buten-1-ynyl)-2,2'-bitienyl [BBT] a 2,2':5'2"-tertienyl, resp. α-tertienyl [α-T] [17]. Tiofény sú rastlinami produkované a akumulované najmä v koreňoch samotných rastlín, pričom dochádza aj k ich uvoľňovaniu do okolitej pôdy [15]. α-tertienyl ako tiofén s majoritným zastúpením, bol označený za hlavnú zlúčeninu s biologickou aktivitou nematocídu, insekticídu, fungicídu a antivirálnej látky [18]. Vďaka tomu je možné využitie tejto rastliny v poľnohospodárstve ako biopesticíd, oproti konvenčne používaním chemickým pesticídom, pričom nepredstavuje žiadne nebezpečenstvo pre ľudské zdravie [18]. Možné je taktiež pestovanie aksamietnice priamo na poliach medzi kultúrnymi plodinami, kedy dochádza k potlačeniu výskytu škodcov [3]. Champagne a kol. [19] popísali zvýšenú biologickú aktivitu tiofénov po ich vystavení slnečnému alebo UV žiareniu (300 až 400 nm), vďaka čomu majú rastliny pestované v *in vivo* podmienkach vyššiu biopesticídnu aktivitu. Produkcia metabolitov je však ovplyvnená prostredím a nie je možné zaručiť ich stabilnú produkciu.

1.2 Flavonoidy

Tagetes spp. sú bohatým zdrojom rôznych flavonoidných zlúčenín, pričom extrakty z kvetov obsahujú väčšie množstvo flavonoidov v porovnaní s extraktmi z listov. Hlavné zastúpenie v rôznych extraktoch majú flavonoidy patuletín (najväčší obsah), kaempferol, luteolín, deriváty kvercetínu a kvercetagetínu, myricetín, pateletín, patulitrín, allopatuletín a kaempferitrín [20].

1.3 Karotenoidy

Kvety aksamietnic, v závislosti od farby a intenzity farby, obsahujú relatívne veľké množstvo karotenioidov, najmä xantofylov. Luteín a jeho estery, ktoré sa v kvetoch nachádzajú v neviazanej forme, sú najviac zastúpenými karotenoidmi v kvetoch tohto rodu [3,21]. Medzi ďalšie karotenoidy nachádzajúce sa v kvetoch rodu *Tagetes* patria anteraxantín, violaxantín, zeaxantín [22].

1.4 Benzofurány

Benzofurány boli popísané ako jedny z hlavných metabolitov produkovaných rodom *Tagetes*, ktoré vykazujú biopesticídne vlastnosti. Tang a kol. [15] identifikoval tri benzofurány izolované z koreňov *T. patula*, menovite euparín, kumaranón a 6-hydroxy-2-izopropenyl-5-acetyl. Tieto zlúčeniny sú ale produkované v malých množstvách, preto je málo štúdií zaoberajúcich sa ich biologickou aktivitou.

2 Biopesticídy

Za biopesticídy možno označiť organizmy alebo produkty ich metabolizmu schopné potláčať prítomnosť škodcov a parazitov, a to netoxickým a ekologickým spôsobom, nakoľko sú v prostredí ľahko odbúrateľné. Mechanizmov pôsobenia biopesticídov je niekoľko. Najčastejšie dochádza k narušeniu rozmnožovania parazitických organizmov, napríklad prostredníctvom interakcie s ich hormónmi a potlačeniu ich reprodukcie. Ďalším spôsobom pôsobenia biopesticídov je prostredníctvom bioaktívnych látok, ktoré priamo narúšajú biologickú aktivitu parazitov, až dôjde k ich usmrteniu. Takúto

aktivitu majú napríklad kryštalické proteíny, ktoré sú cielene špecifické na potlačenie jedného či viacerých príbuzných druhov parazitov. Tieto proteíny sú najčastejšie produkované mikroorganizmami ako sú baktérie, huby, vírusy a protozoá, alebo sú transgénne produkované priamo v rastlinách [23].

Najvyužívanejším spôsobom aplikácie biopesticídov je prostredníctvom rastlinných extraktov a rôznych rastlinných produktov. Na základe štúdie Ponkiya a kol. [24] prípravky z *T. erecta* majú preukázateľné insekticídne účinky. Pripravené kadidlové tyčinky zo sušeného prášku rastliny odpudzovali a pri dlhodobom vystavení aj usmrcovali moskyty. Pozorovaná bola aj schopnosť potláčať populácie vošiek *Trialeurodes vaporariorum* pri súbežnom pestovaní aksamietnice medzi paradajkami [25]. K potláčaniu dochádza na základe uvoľňovania aromatických lázok, ako napr. limonén, z povrchu rastliny do ovzdušia. Popri súbežnom pestovaní aksamietnic s kultúrnymi plodinami je možné využiť rôzne druhy *Tagetes* ako krycie plodiny na poliach. Využitie má najmä *T. erecta*, nakoľko produkuje väčšie množstvo biomasy. Takýmto pestovaním aksamietnic ako medziplodiny je možné potlačiť prítomnosť nematód v pôde až na niekoľko rokov [18]. V pozorovaní Phoofolo a kol. [26] mali koncentráty extraktov *T. minuta* výrazný efekt potlačenia plodnosti vošiek napádajúcich kapustu (*Brevicoryne brassicae*). Silice z *T. patula* dokážu taktiež účinne hubiť viaceré druhy posteľných roztočov [27]. Popri využití výťažkov z aksamietnic ako biopesticídov, nachádzajú ich produkty uplatnenie aj vďaka iným biologickým aktivitám. Extrakty z aksamietnic sa vyznačujú antibakteriálnymi, antioxidačnými, protizápalovými, analgetickými a antihypertensívnymi účinkami [20].

3 *In vitro* produkcia biopesticídov

V dôsledku čoraz väčšieho povedomia verejnosti o potrebe ekologického a trvalo udržateľného pestovania poľnohospodárskych plodín, sa zvyšuje dopyt po biologicky produkovaných pesticídov. Tie väčšinou nepredstavujú hrozbu z hľadiska dlhodobej akumulácie v prostredí, nakoľko sú ako bioprodukty v prostredí ľahko rozložiteľné. Tento zvyšujúci sa dopyt po biopesticídoch si vyžaduje nové prístupy ich produkcie. Najlepším spôsobom ich trvalo udržateľnej produkcie sú *in vitro* kultivačné systémy [28]. K najvýraznejšej akumulácií biopesticídnych zlúčenín, najmä tiofénov, dochádza počas prvého týždňa od germinácie s následným poklesom obsahu počas ďalších dní rastu rastliny [29]. Bola pozorovaná veľká variácia v produkcii tiofénov v kalusových kultúrach rôznych druhov *Tagetes*. Pri viacnásobnom pasážovaní kalusových kultúr však dochádzalo k usmrteniu buniek kalusu z dôvodu vysokej akumulácie polyfenolických zlúčenín [30,31]. Podaľa Ketel a kol. [30] je možné zabrániť toxickej akumulácií metabolitov v bunkách prostredníctvom imobilizácie buniek a vystavení takýchto kultúr stresovým podmienkam. Takto elicitované bunky následne vylučujú sekundárne metabolity pre svoju obranu do extracelulárneho priestoru, odkiaľ je jednoduché ich izolovať. Na porovnanie, Poli a kol. [32] zaznamenali úbytok obsahu BBT a α-T až po 7 týždňoch subkultivácie kalusov a naopak nárast obsahu BBTO a BBTOAC až po 15 týždeň subkultivácie. K zvýšeniu produkcii tiofénov v kalusových kultúrach môže dôjsť aj transformáciou rastlinných buniek pomocou rôznych kmeňov *A. tumefaciens* či *A. rhizogenes*. Nárast produkcie tiofénov pritom závisí od použitého kmeňa [31]. Jednými z ďalších využiteľných elicitorov sú myceliárne extrakty vláknitých húb. Extrakt z *Aspergillus niger* zvýšil produkciu tiofénov v hairy-roots kultúrach *T. patula* o 185% [33]. Maximálny obsah tiofénov bol pritom zaznamenaný s hodnotou 0,138% (w/w) [34]. Obdobne, zvýšenie produkcie tiofénov pri vystavení hairy-roots kultúr *T. patula* extraktom *Fusarium conglutinans* zaznamenali aj Mukundan a Hjortso [35]. Hairy-roots kultúry sa ukazujú byť ideálnymi systémami na produkciu tiofénov, nakoľko k najväčšej akumulácii dochádza práve v koreňoch rastlín. Gupta a kol. [36] zaznamenali až 4-násobne vyššiu produkciu tiofénov v hairy-roots kultúrach *T. erecta* v porovnaní s divo rastúcimi rastlinami. Maximálny obsah tiofénov pritom dosiahli hairy-roots subkultúry v 15 deň kultivácie, s najvyšším obsahom 0,96 mg/g suchej hmoty. Hernández a Ham [37] sa vo svojej štúdií venovali možnosti využitia genetických modifikácií cielených génov regulujúcich metabolické dráhy produkcie bioaktívnych látok. Práve transformácia rastlín môže viesť k lepšiemu uplatnenie biopesticídov na trhu ako výsledok usmernenie metabolizmu rastlín s cieľom zvýšiť produkciu záujmových bioaktívnych látok.

Záver

Mnohé rastliny prirodzene disponujú bioaktívnymi látkami, ktoré sa vyznačujú biopesticídnymi vlastnosťami. Rod *Tagetes* je významným producentom biopesticídov, ktoré už nachádzajú v praxi uplatnenie. Hlavnými biopesticídnymi látkami v aksamietniciach sú štyri tiofény: BBTO, BBTOAC, BBT a α-T. Mnohými štúdiami boli dokázané ich antinematódne a insekticídne vlastnosti. Tieto zlúčeniny sú preto objektom záujmu pre biotechnologickú produkciu biopesticídov v *in vitro*

kultivačných systémoch rastlín. Ako osvedčenou metódou produkcie tiofénov z aksamietnic sa ukazujú hairy-roots kultúry. Tieto transgénne kultúry je jednoduché udržiavať v *in vitro* podmienkach, pričom dochádza k intracelulárnej ale aj extracelulárnej akumulácii tiofénov. Získané extrakty je možné aplikovať pri príprave produktov určených na reguláciu škodcov. V praxi sa najviac aksamietnice uplatňujú ako spolupestované rastliny s kultúrnymi plodinami, kedy chránia tieto plodiny pred škodcami ako v nadzemných častiach, tak koreňovej sústave. Bolo však popísaných málo štúdií zaoberajúcimi sa aplikáciou extraktov aksamietnic na plodiny vo forme aerosolových sprejov [38]. Táto metóda môže byť preto potenciálnym objektom skúmania využitia biopesticídov z *Tagetes* spp. v praxi.

Použitá literatúra

[1] HERNÁNDEZ, G. – HAM, M.D. 2007. Marigold Biotechnology: Tissue Culture and Genetic Transformation. In Transgenic Plant Journal, vol. 1, no. 1, pp. 169-174. ISSN 1749-0413.

[2] HADDEN, W.L. et al. 1999. Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. In Journal of agricultural and food chemistry, vol. 47, no. 10, pp. 4189–4194. ISSN 0021-8561.

[3] GUPTA, Y.CH. et al. Marigold. In DATTA, S.K. – GUPTA, Y.CH. Floriculture and Ornamental Plants. Handbooks of Crop Diversity: Conservation and Use of Plant Genetic Resources. Singapore: Springer, 2022, pp. 1-23. ISBN 978-981-15-3517-8.

[4] ALI, N. et al. 2014. Composition of essential oil from *Tagetes minuta* and its cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities. Natural product communications, vol. 9, no. 4, pp. 265-268. ISSN 1934-578X.

[5] WEAVER, D.K. et al. 1994. Insecticidal Activity of Floral, Foliar, and Root Extracts of *Tagetes minuta* (Asterales: *Asteraceae*) Against Adult Mexican Bean Weevils (Coleoptera: *Bruchidae*). In Journal of Economic Entomology, vol. 87, no. 6, pp. 1718–1725. ISSN 0022-0493.

[6] HOOKS, C.R.R. et al. 2010. Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. In Applied Soil Ecology, vol. 46, no. 3, pp. 307-320. ISSN 0929-1393.

[7] SAHA, S. et al. 2012. Antifungal Acetylinic Thiophenes from *Tagetes minuta*: Potential Biopesticide. In Journal of Applied Botany and Food Quality, vol. 85, no. 2 pp. 207 – 211 ISSN 1439-040X.

[8] DASGUPTA, N. et al. 2012. Antibacterial activity of leaf extract of Mexican marigold (*Tagetes erecta*) against different gram positive and gram-negative bacterial strains. In Journal of Pharmacy Research, vol. 5, no. 8, pp. 4201–4203. ISSN 0974-6943.

[9] NAKBANPOTE, W. et al. Chapter 9 - Potential of Ornamental Plants for Phytoremediation of Heavy Metals and Income Generation In PRASAD, M.N.V. Bioremediation and Bioeconomy Telangana: Elsevier, 2016, pp. 179-217. ISBN 978-0-12-802830-8.

[10] GUPTA, P. – VASUDEVA, N. 2012. Marigold A Potential Ornamental Plant Drug. In Hamdard Medicus, vol. 55, no. 1, pp. 45-59. ISSN 0250-4723.

[11] POLITI, F.A.S. et al. 2018. Chemical Composition and In vitro Anthelmintic Activity of Extracts of *Tagetes patula* Against a Multidrug-Resistant Isolate of *Haemonchus contortus*. In Chemistry & biodiversity, vol. 15, no. 2, e1700507. ISSN 1612-1872.

[12] POLITI, F. A. S. et al. 2016. Insecticidal activity of an essential oil of *Tagetes patula* L. (*Asteraceae*) on common bed bug *Cimex lectularius* L. and molecular docking of major compounds at the catalytic site of ClAChE1. In Parasitology Research, vol. 116, no. 1, pp. 415–424. ISSN 0932-0113.

[13] KRISHNA, A. et al. 2004. Composition of the Essential Oils of the Leaves and Flowers of *Tagetes erecta* L. In Journal of Essential Oil Research, vol. 16, no. 6, pp. 520-522. ISSN 2163-8152.

[14] GONZALEZ, J. L. et al. 2007. Synthesis and antiparasitic evaluation of bis-2,5-[4-guanidinophenyl]thiophenes. In European Journal of Medicinal Chemistry, vol. 42, no. 4, pp. 552–557.
ISSN 0223-5234.

[15] TANG, C. S. et al. 1987. Thiophenes and benzofurans in the undisturbed rhizosphere of *Tagetes patula* L. In Plant and Soil, vol. 98, no. 1, pp. 93–97. ISSN 0032-079X.

[16] KENCHAPPA, R. et al. 2016. Antifungal and antihelmintic activity of novel benzofuran derivatives containing thiazolo benzimidazole nucleus: an in vitro evaluation. In Journal of Chemical Biology, vol. 10, no. 1, pp. 11–23. ISSN 1864-6158.

[17] DOWNUM, K.R. – TOWERS, G.H.N. 1983. Analysis of thiophenes in the *Tageteae* (*Asteraceae*) by HPLC. In Journal of Natatural Products, vol. 46, no. 1, pp. 98-103. ISSN 0163-3864.

[18] BAKSHI, L. – GHOSH, R. 2022. Marigold biopesticide as an alternative to conventional chemical pesticides. In Journal of Advanced

Scientific Research, vol. 13, no. 5, pp. 26-33. ISSN 0976-9595.

[19] CHAMPAGNE, D.E. et al. 1984. Photosensitization and feeding deterrence of *Euxoa messoria* (*Lepidoptera*: *Noctuiidae*) by α-terthienyl, a naturally occurring thiophene from the *Asteraceae*. In Experientia, vol. 40, no. 6, pp. 577–578. ISSN 1420-682X.

[20] RIAZ, M. et al. 2020. Traditional uses, Phyto-chemistry and pharmacological activities of *Tagetes patula* L. In Journal of Ethnopharmacology, vol. 255, e112718. ISSN 0378-8741.

[21] BHATTACHARYYA, S. et al. 2008. Lutein content, fatty acid composition and enzymatic modification of lutein from marigold (*Tagetes patula* L.) flower petals. In Journal of the Indian Chemical Society, vol. 85, no. 9, pp. 942–944. ISSN 0019-4522.

[22] SANAE KISHIMOTO, K.S., et al. 2007. Three routes to orange petal color via carotenoid components in 9 compositae species. In Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, vol. 76, no. 3, pp. 250–257. ISSN 0013-7626.

[23] BILGRAMI, A. – KHAN, A. Chapter 1 – Introduction. In BILGRAMI, A. – KHAN, A. Plant Nematode Biopesticides. Cambridge: Academic Press, 2022, pp. 1-15. ISBN 978-0-12-823006-0.

[24] PONKIYA, N. et al. 2018. Development of economical mosquito repellent using marigold plant. In International Journal for Research Trends and Innovation, vol. 3, no. 11, pp. 47-54. ISSN 2456-3315.

[25] CONBOY, N.J.A. et al. 2019. Companion planting with French marigolds protects tomato plants from glasshouse whiteflies through the emission of airborne limonene. In PLoS ONE, vol. 14, no. 3, pp. 1-21, e0213071. ISSN 1932-6203.

[26] PHOOFOLO M.W. et al. 2013. Laboratory assessment of insecticidal properties of *Tagetes minuta* crude extracts against *Brevicoryne brassicae* on cabbage. In International Journal of Entomology and Nematology, vol. 1, no. 6, pp. 134–139. ISSN 2006-9855.

[27] POLITI F.A., et al. 2017. Insecticidal activity of an essential oil of *Tagetes patula* L. (*Asteraceae*) on common bed bug *Cimex lectularius* L. and molecular docking of major compounds at the catalytic site of ClAChE1. In Parasitology research, vol. 116, no. 1, pp. 415–424. ISSN 0932-0113.

[28] GEORGE, J. et al. 2000. Biotechnological Production of Plant-Based Insecticides. In Critical Reviews in Biotechnology, vol. 20, no. 1, pp. 49–77. ISSN 0738-8551.

[29] SUTFELD, R. 1982. Distribution of thiophene derivatives in different organs of *Tagetes patula* seedlings grown under various conditions. In Planta, vol. 156, no., pp. 536–540. ISSN 0032-0935.

[30] KETEL, D. H. 1987. Distribution and accumulation of thiophenes in plants and calli of different *Tagetes* species. In Journal of Experimental Botany, vol. 38, no. 187, pp. 322–330. ISSN 0022-0957.

[31] NORTON, R. A. et al. 1985. Thiophene production by crown galls and callus tissues of *Tagetes patula*. In Phytochemistry, vol. 24, no. 4, pp. 719–722. ISSN 0031-9422.

[32] POLI, F. et al. 1992. Production of Thiophenes in Calli and Suspension Cultures of *Tagetes patula* L. as Influenced by Light/Dark Succession. In Phyton, vol. 31, no. 2, pp. 257-262. ISSN 0079-2047.

[33] BUITELAAR, R.M. et al. 1992. Elicitation of thiophene production by hairy roots of Tagetes patula. In Enzyme and Microbial Technology, vol. 14, no. 1, pp. 2-7. ISSN 0141-0229.

[34] RAJASEKARAN, T. et al. Elicitation of thiophene production by cultured hairy roots of Tagetes patula. In Acta Physiologiae Plantarum, vol. 21, no. 3, pp. 243-247. ISSN 1861-1664.

[35] MUKUNDAN, U. – HJORTSO, M.A. 1990. Effect of fungal elicitor on thiophene production in hairy root cultures of *Tagetes patula*. In Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 33, no. 2, pp. 145-147. ISSN 0175-7598.

[36] GUPTA, V. et al. 2016. In vitro production of thiophenes using hairy root cultures of *Tagetes erecta* (L.). In African Journal of Biotechnology, vol. 15, no. 17, pp. 706-713. ISSN 1684-5315.

[37] GODOY-HERNÁNDEZ, G. – MIRANDA-HAM. 2007. Marigold biotechnology: Tissue culture and genetic transformation. In Transgenic Plant Journal, vol. 1, no. 1, pp. 169-174. ISSN 1749-0413.

[38] MMBONE, S. 2014. Efficacy of *Tagetes minúta* L. and *Tephrosia vogelii* Hook crude leaf extracts on *Tetranychus urticae* (*Acari: tetranychidae*) and *Aphis fabae* (*Homoptera*: *Aphididae*). In African Journal of Food Science and Technology, vol. 5, no. 8, pp. 168-173. ISSN 2141-5455.

Flax tolerance to heavy metal ions and its use in phytoremediation programmes

Mária Pavlovičová[1]
Supervisor: Ildikó Matúšíková[1]
[1]Institute of Chemistry and Environmental Sciences, FNS UCM, Námestie J. Herdu 2, Trnava, 917 01, Slovak Republic
pavlovicova7@ucm.sk, ildiko.matusikova@ucm.sk

Abstract
Toxic metals pose health risks upon entering the food chain. While most European agricultural soils are considered safe enough for food production, there are still many areas where preventive measures are necessary. Continuous contact of plants with high levels of the toxic metal cadmium leads to reduced water intake, nutrient absorption, and photosynthesis activity in plants. In addition, metal intoxication through the food chain poses health risk to animals and human. Phytoremediation of contaminated soil is a cost-effective and environmentally friendly way to remove metals from soil. Flax (*Linum usitatissimum* L.) has been proposed as a candidate crop for such strategies due to its ability to tolerate and accumulate certain heavy metals such as cadmium. The work provides overview on flax's ability to accumulate heavy metals (cadmium) and information on its use (mainly fibre flax varieties) in phytoremediation programmes for cleaning soils.

Key Words: heavy metals, hyperaccumulation, *Linum usitatissimum* L., phytoremediation programmes

Introduction

The accumulation of toxic heavy metals in soil is currently considered a serious environmental problem, with harmful effects on plants and, upon entering the food chain, on animals, including humans. Toxic metal ions cause damage to plant cells by disrupting membrane integrity, blocking functional groups of metabolically significant molecules, enzyme inactivation, and competing with essential metals in biomolecules [1], thereby significantly adversely affecting plant physiological processes [2]. Problems with ecosystem contamination and chemical toxicity (including heavy metals) are often caused by industrial production and population growth. Heavy metals such as chromium, cadmium, mercury, nickel, lead, and copper cause harmful effects on plants, including yield reduction and damage to agrobiological systems [3].

Phytoremediation is an effective, environmentally friendly, and economically viable bioremediation approach, which involves the uptake and accumulation of harmful heavy metals from soil by plants, thereby reducing their concentration in soils. The efficiency of phytoremediation depends on various parameters, including soil properties, type of heavy metal, rhizosphere characteristics, and its microflora, etc. [4]. Plants suitable for phytoremediation are termed hyperaccumulators. These unique plants accumulate certain metals or metalloids in their tissues at levels that can be hundreds or thousands of times higher than normal for most plants [5]. Parameters influencing the uptake and accumulation of heavy metals by hyperaccumulator plants include soil pH, soil cation exchange capacity, organic matter content in the soil, etc. [6, 7, 8].

Hyperaccumulators remove heavy metals from soil, detoxify them, or accumulate them in the plant. Hyperaccumulators can absorb and accumulate more than two heavy metals depending on their uptake and transport capabilities into tissues [9]. Limitations of hyperaccumulator plants include their specificity for individual metals, meaning they do not accumulate all heavy metals in the soil. They are usually rare and grow only in certain remote regions [5, 10]. Most hyperaccumulators have the disadvantage of having small biomass, so some agricultural crops are also considered for phytoremediation programmes.

1 Mechanism of heavy metal accumulation

Hyperaccumulation of heavy metals in plants involves the transport of metals across the plasma membrane, entry into the xylem and transport to shoots, detoxification, and sequestration of heavy metals at the cellular level [11]. Metals are transported in the phloem in the form of complexes with nicotinamide, amino acids, or organic acids. In hyperaccumulators, large amounts of heavy metals accumulate in roots and shoots [12, 13].

Improved tolerance in hyperaccumulating plants is

attributed to the increased presence of chelating molecules in plant cells, such as metallothioneins, phytochelatins, and cysteine-rich proteins [14, 15]. Phytochelatins are enzymatically synthesized peptides, whereas metallothioneins are polypeptides encoded by genes [16]. Tolerance mechanisms of hyperaccumulators include compartmentalization, limitation of metal uptake, and metal exclusion from the plant, in addition to chelation [17]. Metals in hyperaccumulators are often stored in vacuoles. Heavy metals are transported across the plasma membrane of plant cells along with other essential nutrients [18].

2 The use of flax in phytoremediation programmes

In the agricultural sector, soil contamination with heavy metals is a problem in terms of potential food contamination and harmful biological impacts on the biota [19, 20]. At the same time, negative impacts of metal toxicity negatively impact agricultural production. Crop species are considered, therefore, not only for food safety, but also as tools for soil remediation. It is imperative to recognize that edible plants are unsuitable for phytoremediation due to potential adverse effects on human or animal health upon consumption. Consequently, fibre crops are considered the most suitable choice for phytoremediation purposes. Fibre plants follow a planting and harvesting cycle, facilitating the gradual reduction of heavy metal contamination in the soil over time. The harvested fibre is utilized in the production of biomaterials like paper and textiles, effectively preventing its entry into the food chain and averting adverse environmental impacts on human or animal health [21]. This strategic approach ensures that phytoremediation efforts prioritize environmental sustainability while minimizing risks associated with heavy metal exposure in agricultural ecosystems.

Flax is one of the rhizomatic species of perennial plants that cover large areas of forest soil in tropical regions and are mainly distributed in Asia and the USA. It protects the ecosystem, the environment, and has excellent potential as a green adsorbent [22]. It produces a relatively large amount of aboveground biomass. When grown on contaminated soils, metals are transported from roots to aboveground parts of flax. Flax processing technology includes harvesting procedures, regulating heavy metal uptake by applying suitable agronomic measures, and plant protection. The technology also ensures economic efficiency, represented by harvesting time, phytoextraction costs, and reducing phytoremediation costs by adding new biomass products contaminated with heavy metals [23]. Flax primarily uptakes and tolerates cadmium, lead,and nickel. The amount of metal uptake and allocation depends on the type of metal and flax variety. Metals like cadmium and lead are also deposited in flax seeds, but in lower concentrations than in stems and leaves [24]. Bjelková et al. [25] described tissue-specific metal allocation in different varieties. While the "Merkur" variety showed a high content of Cd exclusively in the roots, the "Jitka" variety transported cadmium to aboveground parts. Smykalova et al. [26] identified varieties Llona, Tabor, and Merkur as tolerant to Zn and Cd, while varieties Benátky, Lola and Jitka were described as Cd-accumulating varieties; Viltstar was described as sensitive to Cd and Zn. In the study by Hosman et al. [27], flax plants accumulated large amounts of heavy metals from the soil, with bioaccumulation factor (BAF) and translocation factor (TF) values for Zn and Pb greater than 1 (indicating a hyperaccumulator for both metals), but less than 1 for Cd (indicating a Cd excluder). However, most studies discuss the potential of flax for Cd phytoremediation [28].

Cleophas et al. [29] analyzed the potential of fibre plants like hemp (*Cannabis sativa*), kenaf (*Hibiscus cannabinus*), jute (*Corchorus olitorius*) and flax from various places and compared their capability to remove heavy metals like Pb, Cd and Zn from contaminated soil. They recognized flax and hemp as of similar because they are both cellulose fibres, though with different genetics (numbers of chromosomes). Concerning remediation capability, they recognized hemp as accumulating most Zn in roots compared to other species, while jute turned most absorbing cadmium. Flax exerted similar efficiency in Pb and Zn accumulation in roots as reported for jute or kenaf. The authors suggested bast fibre plants as clearly accumulating metals in vegetative and reproductive organs and identified hemp as the species accumulating the most- and flax as the species accumulating the least amount of metals. At the same time, they concluded that jute is the more tolerant and best removing Cd from soils as compared to others crops [29].

Similarly, Shehata et al. [30] recognized kenaf as better metal accumulator than flax, while gibberellin and humic acid were foliar applied to enhance plant growth under growth in contaminated soil. In the study, kenaf appeared of more favourable for removal of Cr, Co and Cd, while flax was of higher superiority in the removal of Mn. Phytoremediation efficiency of flax was

identified in order of Mn > Cr > Co > Cd, with corresponding removal percentage values 54.36, 36.95, 28.72, and 11.37%, respectively. Interestingly, double season phytoremediation efficiency followed the order of Cr ≥ Mn > Co > Cd and achieved the rates of 66.87, 65.63, 54.66, and 23.40%, respectively. Nevertheless, both flax and kenaf were concluded as effective phytoremediators where they accumulate heavy metals in noticeable contents especially inside their roots more than shoot tissues, while flax was more efficient in case of Mn only [30]. At the same time, flax was recommended to be planted with sulfur and humic acid to remove Co and Cr more efficiently from soils, whereas sulfur and gibberellin were recommended for soils of high Cd and Mn [30].

In a controlled experiment, Wielgusz et al. [31] subjected four Polish linseed varieties - Bukoz, Szafir, Olivin, and Jantarol - to varying soil conditions and cadmium (Cd) concentrations. The utilized soils had two distinct pH levels: acidic (pH 4.5) and alkaline (pH 7.5). The findings confirmed the importance of soil pH in linseed cultivation as previously described in literature. Highest seed yield with the lowest Cd content was observed in the "Bukoz" variety under conditions of 100 $kg.ha^{-1}$ phosphorous fertilization and pH 7.5.Since this study confirmed the possibility to mitigating cadmium uptake in linseed cultivation by controlling soil conditions and fertilization practices, the opposite strategy likely allows for using flax in remediation programmes.

3 Flax

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is an annual dicotyledonous plant with significant economic value, belonging to the Linaceae family. It is primarily used for fibre and food purposes, predominantly in cooler regions of the world. Flax is one of the oldest fibre crops cultivated mainly in China and India, but also in Canada, Russia, Kazakhstan, and the USA [32, 33, 34, 35]. Poland is the main producer of flax among European countries [28]. Flax fibre is three times stronger than cotton, thus it is used in canvas production in many textile industries, as well as in the production of decorative fabrics, sturdy yarns, ropes, and tires [36, 37]. Flax seeds possess numerous nutritional properties, particularly due to their high concentration of short-chain omega-3 fatty acids. Consumption of flaxseeds helps in the prevention of heart diseases, stroke, cancer, and diabetes [23, 38]. Flax seeds contain 20-25% protein and 40-45% fatty acids. Flaxseed oil, produced from flax, is used for pharmaceutical purposes. It is also utilized in the form of processed solvents, such as drying oil medium / reagent, varnish, and paint [28].

The agricultural productivity of flax cultivation is negatively affected by abiotic stress factors such as ecosystem salinization and temperature [39], as well as various pathogenic fungi [40]. Flax exhibits high tolerance to heavy metals. For example, several varieties of fibre flax and linseed, including varieties Belinka, Escalina, Jitka, Marina and Krasnoder, have demonstrated tolerance to cadmium (Cd) in soil concentrations of up to 1 g of metal per kg of soil, exhibiting no visible signs of toxicity or only minimal growth reduction and developmental aberrations in the stems [41]. In hydroponic conditions, plantlets of mentioned flax varieties exposed to short-term Cd stress showed no visible symptoms of metal toxicity, such as necrosis or chlorosis. The tolerance indexes based on fresh weight data ranged from 63% to 85% [41]. Conversely, doses of 10, 20 and 40 mg $CdCl_2$ per kg of soil were found to be toxic but sublethal, inhibiting flax growth [27]. In a study by Pavlovičová et al. [41] the variety Krasnoder exhibited the highest tolerance to Cd, with unaffected growth, including shoot length. Conversely, Escalina appeared to be the least tolerant, with noticeable shoot length reduction, particularly in the variety Jitka. Furthermore, stressed variants in the Belinka and Escalina varieties contained significantly more chlorophyll than the corresponding controls. Genotype-dependent sensitivity to Cd has been documented in flax [25].

Guo et al. [21] conducted a field experiment in a Cd-contaminated area in southern China, involving nine flax, one dual-purpose, and eight linseed cultivars analyzed the phytoextraction of cadmium. They studied uptake, translocation, and organ-specific accumulation across different cultivars. Among the 18 flax/linseed cultivars tested, one flax cultivar (Zhongya 1) and two linseed cultivars (Y2I329 and Y2I330) exhibited Cd extraction rates exceeding 60 $g.ha^{-1}$, indicating their potential as Cd accumulators for phytoremediation of Cd-contaminated soil.

Accumulation rate of Cd also varieties among flax genotypes. Gamaspectrometry has been used to assess the dynamics of metal uptake by 5 flax varieties after 10 days of cultivation in growth medium with radioactive metal isotope [41]. The highest amounts of ^{109}Cd were determined in the variety Jitka and Escalina, on the contrary the least in the variety Belinka (Fig. 1). Such variability in metal uptake likely coincides with tolerance to metal toxicity, although metal

accumulation and tolerance are genetically independent traits. The Cd isotope intake was fastest during the first three days, while overally low metal accumulation of the Belinka variety coincided with the relatively slowest intake rate [41].

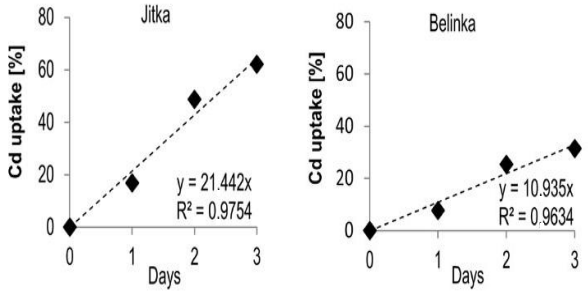


Figure 1 Uptake of cadmium (%) by roots of the tested flax varieties during first three days of experiment. Data were measured by gamaspectrometry using spiked ^{109}Cd and are presented as average values (n=3).
Source: [41]

However, uptake of metals by roots likely exerts specific kinetics and uptake rates, which might depend on the concentration of metal in the growth media, soil characteristics (e.g., pH, presence of chelating agents), and also on sequestration strategies of individual plant genotypes [42].

Results of such experiments render flax a promising candidate for phytoremediation when cultivated in metal-contaminated soil. Studies describing the use of flax for the decontamination of soils contaminated with heavy metals have been published [23, 43, 44]. Therefore, there is growing interest in its utilization for the phytoremediation of various heavy metals [23].

Conclusion

Many studies describe the ability of individual flax varieties to uptake significant amounts of heavy metals, especially cadmium, from the soil. However, to evaluate its applicability fully, comprehensive research on long-term phytoremediation of contaminated sediments is needed to estimate the time and effectiveness of remediating the contaminated site.

Acknowledgement

The paper was supported by the Slovak Research and Development Agency under grant No. APVV-21-0504.

Used literature

[1] RAI, Prabhat Kumar et al. 2020. Molecular mechanisms in phytoremediation of environmental contaminants and prospects of engineered transgenic plants/microbes. In Science of the Total Environment, vol. 705, 135858. ISSN 0048-9697.

[2] MANOJ, Srinivas Ravi et al. 2020. Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: a review. In Journal of Environmental Management, vol. 254, 109779. ISSN 1095-8630.

[3] DIACONU, Mariana et al. 2020. Characterization of heavy metal toxicity in some plants and microorganisms – a preliminary approach for environmental bioremediation. In New Biotechnology, vol. 56, pp. 130-139. ISSN 1871-6784.

[4] YAASHIKAA, P. R. et al. 2022. A review on bioremediation approach for heavy metal detoxification and accumulation in plants. In Environmental Pollution, vol. 301, 119035. ISSN 0269-7491.

[5] RASCIO, Nicoletta – NAVARI-IZZO, Flavia. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?. In Plant Science, vol. 180, pp. 169-181. ISSN 0168-9452.

[6] TANGAHU, Bieby Voijant et al. 2011. A review on heavy metals (as, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. In International Journal of Chemical Engineerin, vol. 2011, ID 939161, pp. 1-31. E-ISSN 2945-0519.

[7] CHIBUIKE, G. U. – OBIORA, Smart Chika. 2014. Heavy metal polluted soils: effect on plants and bioremediation methods. In Applied and Environmental Soil Science, vol. 2014, ID 752708, pp.1-12. ISSN 1687-7667.

[8] RAVANBAKHSH, Mohammadhossein – KOWALCHUK, George A. – JOUSSETET, Alexandre. 2019. Optimization of plant hormonal balance by microorganisms prevents plant heavy metal accumulation. In Journal of Hazardous Materials, vol. 379, 120787. ISSN 0304-3894.

[9] SASSYKOVA, Larissa R. et al. 2020. Heavy metal accumulation in plants of the dry-steppe zone of the East Kazakhstan region. In Materials Today, vol. 33, pp. 1187-1191. ISSN 1369-7021.

[10] MEMON, Abdul Razaque. Metal hyperaccumulators: mechanisms of hyperaccumulation and metal tolerance. In ANSARI,

Abid Ali et al. Phytoremediation. Springer : Cham, 2016, pp. 239-268. ISBN 978-3-319-40148-5.

[11]WOOD, Jennifer L. – TANG, Caixian – FRANKS, Ashley E. 2016. Microbial assisted plant growth and heavy metal accumulation to improve phytoextraction of contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry, vol. 103, pp. 131–137. ISSN 0038-0717.

[12]GUO, JunKang et al. 2020. Effects of EDTA and plant growth-promoting rhizobacteria on plant growth and heavy metal uptake of hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. In Journal of Environmental Sciences, vol. 88, pp. 361–369. E-ISSN 1878-7320.

[13]CUI, Xiaoqiang et al. 2021. A review on the thermal treatment of heavy metal hyperaccumulator: fates of heavy metals and gen eration of products. In Journal of Hazardous Materials, vol. 405, 123832. ISSN 0304-3894.

[14]SHARMA, Pooja et al. 2021. Efficiency of transporter genes and proteins in hyperaccumulator plants for metals tolerance in wastewater treatment: sustainable technique for metal detoxification. In Environmental Technology & Innovation, vol. 23, 101725. ISSN 2352-1864.

[15]FAIZAN, Mohammad et al. 2024. Phytochelatins: key regulator against heavy metal toxicity in plants. In Plant Stress, vol. 11, 100355, ISSN 2667-064X.

[16]COBBETT, Christopher – GOLDSBROUGH, Peter. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. In Annual Review of Plant Biology, vol. 53, pp. 159-182. ISSN 1545-2123.

[17]PAGE, Valérie – FELLER, Urs. 2015. Heavy metals in crop plants: transport and redistribution processes on the whole plant level. In Agronomy, vol. 5, pp. 447-463. ISSN 2073-4395.

[18]SUN, Zheng et al. 2016. Heavy metal accumulation in native plants at a metallurgy waste site in rural areas of Northern China. In Ecological Engineering, vol. 86, pp. 60-68. ISSN 0925-8574.

[19] CLEMENS, Stephan – MA, Jian Feng. 2016. Toxic heavy metal and metalloid accumulation in crop plants and foods. In Annual Review of Plant Biology, vol. 67, pp. 489-512. ISSN 1545-2123.

[20]REHMAN, Ata Ur et al. 2020. Toxicity of heavy metals in plants and animals and their uptake by magnetic iron oxide nanoparticles. In Journal of Molecular Liquids, vol. 321, 114455. ISSN 0167-7322.

[21]GUO, Yuanet et al. 2020. Cadmium ccumulation, translocation, and assessment of eighteen *Linum usitatissimum* L. cultivars growing in heavy metal contaminated soil. In International Journal of Phytoremediation, vol. 22, no. 5, pp. 490-496. ISSN 1522-6514.

[22]CHOUDHURY, Tasrina Rabia et al. 2022. Adsorptive removal of chromium from aqueous solutions using flax (*Linum usitatissimum*): kinetics and equilibrium studies. In Environmental Chemistry and Ecotoxicology, vol. 4, pp. 132-139. ISSN 2590-1826.

[23]SALEEM, Muhammad Hamzah et al. 2020. Appraising growth, oxidative stress and copper phytoextraction potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) grown in soil differentially spiked with copper. In Journal of Environmental Management, vol. 257, 109994. ISSN 1095-8630.

[24]ANGELOVA, Violina et al. 2004. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). In Industrial Crops and Products, vol. 19, no. 3, pp. 197-205. ISSN 0926-6690.

[25]BJELKOVÁ, Marie – GENČUROVÁ, Václava – GRIGA, Miroslav. 2011. Accumulation of cadmium by flax and linseed cultivars in field-simulated conditions: a potential for phytoremediation of Cd-contaminated soils. In Industrial Crops and Products, vol. 33, no. 3, pp. 761-774. ISSN 0926-6690.

[26]SMYKALOVA, Iva et al. 2010. Large scale screening of heavy metal tolerance in flax/linseed (*Linum usitatissimum* L.) tested *in vitro*. In Industrial Crops and Products, vol. 32, no. 3, pp. 527-533. ISSN 0926-6690.

[27]HOSMAN, Mohammed Elanwar et al. 2017. Mechanism of phytoremediation potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) to Pb, Cd and Zn. In Asian Journal of Plant Science and Research, vol. 7, no. 4, pp. 30-40. ISSN 2349-2805.

[28]GRIGA, Miroslav – BJELKOVÁ, Marie. Flax (*Linum usitatissimum* L.) and hemp (*Cannabis sativa* L.) as fibre crops for phytoextraction of heavy metals: biological, agro-technological and economical point of view. In Gupta, Dharmendra Kumar. Plant-based remediation processes. Berlin : Springer, 2013, pp. 199-237. ISBN 978-3-642-35564-6.

[29]CLEOPHAS, Fera Nony et al. 2023. Phytoremediation: a novel approach of bast fiber plants (hemp, kenaf, jute and flax) for heavy metals decontamination in soil—review. In Toxics, vol. 11, no. 1, pp. 5. ISSN 2305-6304.

[30]SHEHATA, Sherine M. – BADAWY Reham K. – ABOULSOUD Yasmin I. E. 2019. Phytoremediation of some heavy metals in contaminated soil. In

Bulletin of the National Research Centre, vol. 43, no. 189, pp. 1-15. ISSN 1110-0591.

[31]WIELGUSZ, Katarzyna. 2023. Analysis of cadmium accumulation in linseed (*Linum Usitatissimum* L.) depending on soil pH and fertilizer level. In Journal of Natural Fibers, vol 20, no. 2, 2229519. ISSN 1544-0478.

[32]SANGEETA, Mukhopadhyay Sangeeta – MAITI, S. K. 2010. Phytoremediation of metal enriched mine waste: a review. In American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental, vol. 9, pp. 560–575. E-ISSN 1990-4053.

[33]FELLER, Urs – ANDERS, Iwona – WEI, Shuhe. 2019. Distribution and redistribution of ^{109}Cd and ^{65}Zn in the heavy metal hyperaccumulator *Solanum nigrum* L.: influence of cadmium and zinc concentrations in the root medium. In Plants, vol. 8, pp. 340. ISSN 2223-7747.

[34]AKHTAR, Mohd Sayeed – CHALI, Birtaut – AZAM, Tanweer. 2013. Bioremediation of arsenic and lead by plants and microbes fromcontaminated soil. In Research in Plant Sciences, vol, 1, pp. 68-73. ISSN 2333-8539.

[35]WISZNIEWSKA, Alina et al. 2016. Natural organic amendments for improved phytoremediation of polluted soils: a review of recent progress. In Pedosphere, vol. 26, pp. 1-12. ISSN 1002-0160.

[36]ZHANG, B. – Zheng, J. – Sharp, R. 2010. Phytoremediation in engineered wetlands: mechanisms and applications. In Procedia Environmental Sciencesi, vol. 2, pp. 1315-1325. ISSN 1878-0296.

[37]SALEEM, Muhammad Hamzah et al. 2019. Copper-induced oxidative stress, initiation of antioxidants and phytoremediation potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) seedlings grown under the mixing of two different soils of China. In Environmental Science and Pollution Research, vol 27, no. 5, pp. 5211-5221. ISSN 1614-7499.

[38]IMRAN, Muhammad et al. 2019. Molybdenum-induced eects on nitrogen metabolism enzymes and elemental profile of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under dierent nitrogen sources. In International Journal of Molecular Sciences, vol. 20, no. 12, pp. 3009. ISSN 1422-0067.

[39]RAKLAI, Anas et al. 2021. Restoring the plant productivity of heavy metal-contaminated soil using phosphate sludge, marble waste, and beneficial microorganisms. In Journal of Environmental Management, vol. 99, pp. 210-221. ISSN 1095-8630.

[40]RASHID, K.Y. 2003. Principal diseases of flax. 1st ed. Boca Raton, Florida, USA : CRC Press, pp. 104-135. ISBN 978-0-429-20585-9.

[41]PAVLOVIČOVÁ, Mária et al. 2020. Variable accumulation of cadmium in flax (*Linum usitatissimum* L.). In Nova Biotechnologica Et Chimica, vol. 19, no. 1, pp. 70–79. E-ISSN 1339-004X.

[42]ADAMCZYK-SZABELA, D. – WOLF, W. M. 2022. The impact of soil pH on heavy metals uptake and photosynthesis efficiency in *Melissa officinalis*, *Taraxacum officinalis*, *Ocimum basilicum*. In Molecules. vol. 27, no. 15, pp. 4671. ISSN 1420-3049.

[43]JEEVANANTHAM, S. et al. 2019. Removal of toxic pollutants from water environment by phytoremediation: a survey on application and future prospects. In Environmental Technology & Innovation, vol. 13, pp 264-276. ISSN 2352-1864.

[44]WANG, Liuwei et al. 2020. Field trials of phytomining and phytoremediation: a critical review of influencing factors and effects of additives. In Critical Reviews in Environmental Science and Technology, vol. 50, pp. 2724-2774. ISSN 1064-3389.

Účinky rakytníka rešetliakového a metformínu na biochemické a štrukturálne parametre diabetickej kosti

The effects of sea buckthorn and methformin on the biochemical and structural parameters of diabetic bone

Noémi Pénzes[1] – Roman Bíro[2] – Veronika Kováčová[3]
Školiteľ: Radoslav Omelka[4]
[1,4]Katedra botaniky a genetiky, FPVaI UKF, Nábrežie mládeže 91, 949 01 Nitra
[2,3]Katedra zoológie a antropológie, FPVaI UKF, Nábrežie mládeže 91, 949 01 Nitra
[1] noemi.penzes@ukf.sk, [2]roman.biro@ukf.sk, [3]vkovacova@ukf.sk, [4]romelka@ukf.sk

Abstrakt
Metformín je farmakologickým preparátom prvej voľby pri liečbe diabetes mellitus typu 2 (T2DM). Plody rakytníka rešetliakového obsahujú bioaktívne látky s antioxidačnou aktivitou, vďaka ktorým disponujú potenciálom využitia pri podpornej liečbe ochorenia T2DM. Skúmali sme účinky metformínu a plodov rakytníka rešetliakového, aplikovaných individuálne a simultánne na biochemické, makroskopické a mikroskopické parametre diabetickej kosti s využitím animálneho modelu. Analyzovali sme 4 skupiny ZDF potkanov: diabetickú kontrolu (C), suplementovanú metformínom (E1), suplementovanú plodmi rakytníka rešetliakového (E2) a so simultánnou aplikáciou (E12). Pri skupine E12 boli zaznamenané znížené hladiny triacylglycerolov (TAG) a zvýšená hustota kostnej hmoty (BMD) špongiózneho kostného tkaniva v porovnaní so skupinou C. Signifikantne znížené hladiny TAG v E12 skupine boli identifikované aj pri porovnaní so skupinou E1. Zaznamenali sme zvýšenú telesnú hmotnosť v skupine E2 oproti skupine C. Z našich výsledkov vyplýva, že simultánna aplikácia rakytníka rešetliakového a metformínu zmierňuje hypertriglyceridémiu a pozitívne ovplyvňuje BMD špongiózneho kostného tkaniva.
Kľúčové slová: metformín, rakytník rešetliakový, liečba

Abstract
Metformin is a first-choice pharmacological drug in the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM). Sea buckthorn fruits contain bioactive substances with antioxidant activity, thanks to which they have the potential to be used as a supportive treatment to cure T2DM. We examined the effects of metformin and sea buckthorn fruits, applied individually and simultaneously on biochemical, macroscopic, and microscopic parameters of diabetic bone using an animal model. We analysed 4 groups of ZDF rats: diabetic control (C), supplemented with metformin (E1), supplemented with sea buckthorn fruits (E2) and supplemented simultaneously (E12). Decreased levels of triglyceride (TAG) and increased bone mineral density (BMD) of cancellous bone tissue were observed in the E12 group compared to the C group. Significantly reduced levels of TAG in the E12 group were also identified compared to the E1 group. We noted an increased body weight in the E2 group compared to the C group. Our results show that the simultaneous application of sea buckthorn and metformin alleviates hypertriglyceridemia and positively affects the BMD of cancellous bone tissue.
Key words: metformin, sea buckthorn, treatment

Úvod

Ochorenie diabetes mellitus (DM) patrí medzi najzávažnejšie a najrozšírenejšie ochorenie súčasnosti. Globálna prevalencia diabetu u dospelých vo veku 20-79 rokov sa v roku 2021 odhadovala na 10,5 % a predpokladá sa, že do roku 2045 vzrastie na 12,2 % [1]. DM je metabolické ochorenie, charakteristické chronickou hyperglykémiou v dôsledku rezistencie na inzulín a poruchou sekrécie inzulínu. Najčastejšie sa vyskytujúcou formou je diabetes mellitus typu 2 (T2DM), ktorý je charakterizovaný dysfunkciou β-buniek, relatívnym nedostatkom sekrécie inzulínu a inzulínovou rezistenciou v periférnych cieľových tkanivách spojenou s nedostatkom inzulínových receptorov [2,3]. T2DM je asociovaný s mnohými sekundárnymi komplikáciami, medzi ktoré patria diabetická kardiomyopatia , cievna mozgová príhoda, diabetická retinopatia, nefropatia a diabetické poškodenie kosti. Tieto komplikácie majú negatívny vplyv na zdravotný stav pacientov trpiacich T2DM [4,5]. Diabetické poškodenie kosti sa prejavuje poruchou kostného metabolizmu, zvýšeným úbytkom kostnej hmoty a poškodenou mikroarchitektúrou kostného

tkaniva, čo vedie k zhoršeniu kvality kostí a k zvýšeniu kostných fraktúr [6]. Ochorenie T2DM je asociované so zníženou hladinou markerov kostnej remodelácie, zvýšeným obsahom sklerostínu (inhibítor tvorby kosti) a AGE (konečné produkty koncovej glykácie). Hyperglykémia a akumulácia AGE v kosti u starších pacientov je sprevádzaná so zvýšenou krehkosťou kostí [7]. Taktiež bola preukázaná aj zvýšená pórovitosť kompaktného kostného tkaniva u pacientov s T2DM [8].

Prvou voľbou liečby u pacientov trpiacich T2DM je metformín. Metformín patrí medzi biguanidy a signifikantne zmierňuje hyperglykémiu a hyperlipidémiu. Účinok tohto biguanidu je asociovaný so zníženou produkciou glukózy v pečeni, zvýšením citlivosti na inzulín vo svaloch, zlepšením periférneho vychytávania a utilizácie glukózy a spomalením vstrebávania glukózy v črevách [9,10]. Disponuje protizápalovými, antiapoptotickými a antioxidačnými účinkami [11]. Avšak dlhodobé užívanie farmakologických liečiv môže spôsobiť aj viaceré vedľajšie účinky. Látky rastlinného pôvodu môžu poskytnúť alternatívnu formu podpornej terapie pri liečbe T2DM. Niekoľko štúdii poukázalo na priaznivé účinky plodov Cornus mas L. (drieň obyčajný) a včelieho produktu pergy pri zmiernení symptómov T2DM, súvisiacich so zníženou kvalitou kosti a hyperlipidémiou pri ZDF potkanoch [12,13]. Zdrojom bioaktívnych látok s antioxidačnými účinkami je aj rakytník rešetliakový (Hippophae rhamnoides L.).

Rakytník rešetliakový rastie v Ázii a Európe a patrí do čeľade Eleagnaceae [14]. Jeho oranžovo-žlté plody obsahujú vysoké množstvo vitamínu K a C, tokoferolov, karotenoidov, polyfenolových zlúčenín, fytosterolov, kumarínov, triterpínov a zinku. [15]. Aj vďaka obsahu týchto fytochemikálii, rakytník rešetliakový disponuje antioxidačnými, antidiabetickými, protizápalovými, kardioprotektívnymi a antikarcinogénnymi účinkami [16].

V rámci našej štúdie sme skúmali vplyv aplikácie metformínu a plodov rakytníka rešetliakového individuálne a simultánne na biochemické a makroskopické parametre a taktiež na mikroštruktúru stehnovej kosti experimentálneho animálneho modelu ZDF potkanov.

1 Materiál a metodika

V tejto časti si popíšeme použitý materiál a metódy spracovania tohto materiálu, ktorý bol použitý vo výskume.

1.1 Animálny model

Experimentálnym zvieracím modelom boli samce ZDF potkanov u ktorých sa vyskytuje T2DM. Pre tieto potkany je charakteristická obezita, hyperglykémia, hyperlipidémia, hyperinzulinémia a inzulínová rezistencia. V období 3 mesiacov potkanom sa aplikoval metformín (rozpustený v destilovanej vode) a rakytník rešetliakový (plody homogenizované vo vode) pomocou orálnej sondy. Potkany boli rozdelené do nasledujúcich skupín v počte 6 jedincov v každej skupine: C (diabetická kontrola), E1 (metformín v dávke 150 mg/kg živej hmotnosti(ž.h.)/deň), E2 (rakytník rešetliakový v dávke 500 mg/kg ž.h./deň), E12 (simultánne rakytník rešetliakový v dávke 500 mg/kg ž.h./deň a metformín v dávke 150 mg/kg ž.h./deň).

Štúdia bola schválená Etickou komisiou a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR, číslo schválenia Ro-2674-3/2021–220.

1.2 Biochemická analýza

Stanovili sme hladinu glukózy (GLU) z krvi jednotlivých ZDF potkanov a hladinu inzulínu (INZ), celkového cholesterolu (CHOL), triacylglycerolov (TAG) a alkalickej fosfatázy (ALP) z krvných sér.

1.3 Makroskopická analýza

Determinovali sme celkovú telesnú hmotnosť experimentálnych zvierat, dĺžku a hmotnosť oboch femurov.

1.4 Mikropočítačová tomografia

V rámci mikroštruktúralnej analýzy sme určili kvantitatívne 3D parametre kompaktného a špongiózneho kostného tkaniva pomocou mikropočítačovej tomografie (µCT 50, Scanco Medical). V kompaktnom kostnom tkanive sme analyzovali relatívny objem kosti, hrúbku a povrch kompaktnej kosti, hustotu kostnej hmoty. V špongióznom kostnom tkanive sme analyzovali relatívny objem kosti, povrch kosti, hustotu kostnej hmoty a počet, hrúbku a separáciu trabekúl.

1.5 Štatistická analýza

Výsledky sú uvedené ako priemer ± smerodajná odchýlka. Rozdiely medzi jednotlivými skupinami sú vyhodnotené prostredníctvom analýzy variácie (ANOVA) a pomocou Tukeyho a Games-Howellow testu. Hodnota nižšia ako hladina významnosti 0,05 bola považovaná za signifikantnú.

2 Výsledky a diskusia

Simultánna aplikácia metformínu a rakytníka rešetliakového (skupina E12) signifikantne znížila hladinu TAG v porovnaní so skupinami C a E1. Najnižšiu hodnotu TAG vykazovala skupina E2, avšak vzhľadom na vysokú smerodajnú odchýlku, rozdiely s kontrolnými skupinami nedosiahli štatistickú významnosť (p=0,1). Zhang et al. (2010) preukázal znížené hladinu TAG u diabetických potkanov, ktorým bol podávaný extrakt so semien rakytníka rešetliakového (v dávkach 400 mg/kg ž.h./deň) [17]. Signifikantne znížené hladiny TAG identifikovali aj Martiniaková et al. (2021), ktorí ZDF potkanom aplikovali pergu v dávke 700 mg/kg ž.h./deň počas 10 týždňov [13]. Podobne, aj Omelka et al. (2020) zistili, že ZDF potkany suplementované drieňom obyčajným (v dávkach 500 mg/kg ž.h./deň a 1000 mg/kg ž.h./deň počas 10 týždňov) mali znížené hladiny TAG porovnaní s kontrolnou diabetickou skupinou [12]. Zvýšený obsah TAG sa považuje za rizikový faktor diabetickej neuropatie, avšak súvislosť medzi hypertriglyceridémiou a diabetickým poškodením kosti zostáva kontroverzná [18].

Nezistili sme žiadne signifikantné zmeny v hladinách glukózy, inzulínu a celkového cholesterolu v jednotlivých skupinách zvierat **(Tab.1)**. Rovnako aj štúdie Dong et al. (2016; dávka 200 mg/kg ž.h./deň počas 3 mesiacov) a Sui et al. (2019; dávka 50 mg/kg ž.h./deň počas 6 mesiacov), ktorý liečili ZDF potkany s metformínom nezaznamenali žiadne zmeny hladín v týchto parametrov [19, 20]. Z nameraných hodnôt však možno pozorovať trend v znížení hladín glukózy, inzulínu a ALP v skupinách s metformínom. V hladinách ALP sme nezaznamenali žiadne signifikantné zmeny v rámci všetkých skupín.

Tab. 1. Výsledky z biochemických analýz

Skupiny	C	E1	E2	E12	Sig.
N	6	6	6	6	
GLU (mM/L±SD)	**21,9** ±8,17	**15,8** ±2,68	**14,3** ±2,7	**15,5** ±2,17	NS
INZ (µg/L±SD)	**0,74** ±0,26	**0,44** ±0,29	**0,72** ±0,48	**0,46** ±0,23	NS
CHOL (mM/L±SD)	**4,43** ±1,09	**3,63** ±0,29	**3,47** ±0,49	**3,66** ±0,47	NS
TAG (mM/L±SD)	**8,99** ±0,16	**8,97** ±0,14	**6,55** ±1,96	**8,45** ±0,11	*** E12 vs. C, E1
ALP (U/L±SD)	**117** ±46,7	**76,5** ±7,63	**68,4** ±22,7	**91,3** ±19,4	NS

*** p<0,001

Analýzou makroskopických ukazovateľov sme zistili štatisticky významné zvýšenie telesnej hmotnosti skupiny E2 porovnaní C. Podobne signifikantný nárast v celkovej telesnej hmotnosti pozorovali aj Dupak et al. (2022) [21]. V hmotnosti a dĺžke femurov sme nezaznamenali žiadne signifikantné zmeny **(Tab. 2).**

Tab. 2. Výsledky z makroskopických analýz

Skupina	C	E1	E2	E12	Sig.
N	6	6	6	6	
Hmotnosť jedincov (g±SD)	**503** ±64,9	**557** ±20,41	**631** ±53,33	**567** ±77,63	* E2 vs. C
Hmotnosť femuru (g±SD)	**0,83** ±0.07	**0,839** ±0,05	**0,885** ±0,1	**0,833** ±0,06	NS
Dĺžka femuru (cm±SD)	**3,60** ±0,09	**3,66** ±0,03	**3,66** ±0,09	**3,59** ±0,05	NS

* p<0,05

V rámci kvantitatívnej 3D analýzy sme zaznamenali signifikantné zvýšenie hustoty kostnej hmoty (BMD) špongiózneho kostného tkaniva v skupine E12 v porovnaní s C. Rovnako aj Omelka et al. (2020) zaznamenali nárast BMD špongiózneho kostného tkaniva u ZDF potkanoch liečeným drieňom obyčajným a Martiniaková et al. (2021) pri aplikácii pergy [12, 13]. Vo zvyšných parametroch špongiózneho kostného tkaniva sme nezaznamenali signifikantné rozdiely, je možné len pozorovať trend zvyšovania parametrov, ktoré čiastočne súvisia s BMD **(Tab. 3.).**

Tab.3. Výsledky kvantitatívnej 3D analýzy špongiózneho kostného tkaniva

Skupina	C	E1	E2	E12	Sig.
N	6	6	6	6	
Relatívny objem špon. (%)	**18,9** ±6,4	**20,6** ±4,0	**23,3** ±4,3	**24** ±8,8	NS
Povrch špon. (mm^2)	**90,1** ±45,3	**95,3** ±17,3	**104** ±22,8	**104** ±43,1	NS
BMD špon. ($mgHA/cm^3$)	**542** ±26,4	**555** ±40	**581** ±27	**596** ±35,2	*

					E12 vs. C
Počet trab. špon. (1/mm)	**2,23** ±0.98	**2,2** ±0,45	**2,34** ±0,3	**2,53** ±0,87	NS
Hrúbka trab. špon. (mm)	**0,09** ±0,06	**0,09** ±0,04	**0,1** ±0,06	**0,1** ±0,08	NS
Separácia trab. špon. (mm)	**0,54** ±0,2	**0,5** ±0,13	**0,49** ±0,05	**0,44** ±0,14	NS

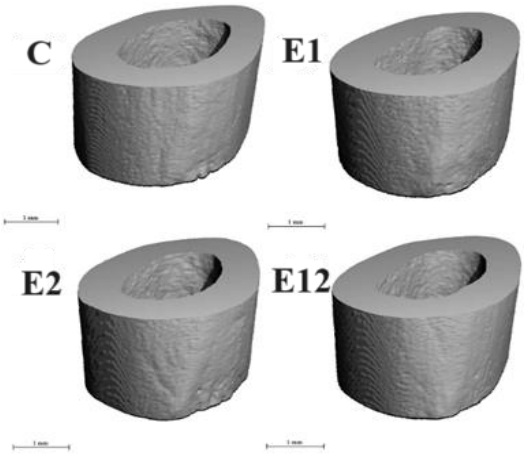
***** p<0,05

Pri kvantitatívnej 3D analýze kompaktného kostného tkaniva sme nezaznamenali žiadne signifikantné zmeny v rámci všetkých parametrov. **(Tab.4.)**.

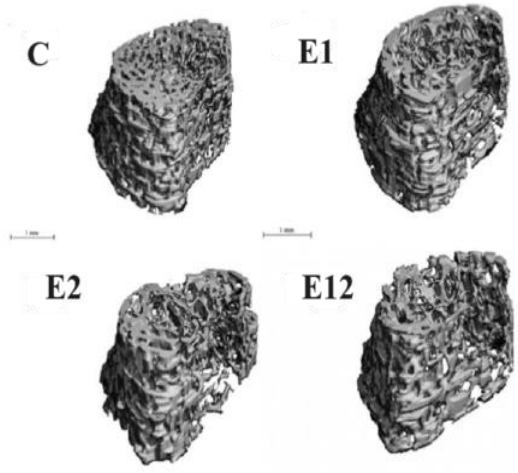
Tab. 4. Výsledky kvantitatívnej analýzy kompaktného kostného tkaniva

Skupiny	C	E1	E2	E12	Sig.
N	6	6	6	6	
Relatívny objem komp. (%)	**98,5** ±0,06	**98,5** ±0,17	**98,5** ±0,19	**98,4** ±0,1	NS
Povrch komp. (mm^2)	**4,73** ±0,54	**5,29** ±0,65	**4,77** ±0,93	**5,14** ±1,61	NS
BMD komp. ($mgHA/cm^3$)	**786** ±35,7	**787** ±33,4	**788** ±38,7	**790** ±24,2	NS
Hrúbka komp. (mm)	**0,70** ±0,03	**0,71** ±0,02	**0,72** ±0,03	**0,70** ±0,02	NS
Plocha komp. (mm^2)	**6,44** ±0,44	**6,62** ±0,35	**6,85** ±0,71	**6,58** ±0,52	NS

3D rekonštrukcie kompaktného a špongiózneho kostného tkaniva sú znázornené na **Obr. 5. a 6.**



Obr. 5 3D rekonštrukcia kompaktného kostného tkaniva.



Obr.6. 3D rekonštrukcia špongiózneho kostného tkaniva.

Záver

Výsledky našej práce dokumentujú, že plody rakytníka aplikované spoločne s liečivom metformín významne znižujú hladiny TAG a stratu kostnej hmoty špongiózneho kostného tkaniva u diabetických potkanov. Táto kombinácia zároveň významne nezvyšuje hmotnosť jedincov. Rakytník rešetliakový tak predstavuje potenciál pri podpornej liečbe T2DM a diabetického poškodenia kosti.

Poďakovanie

Práca vznikla s podporou projektov VEGA 1/0416/22 a VEGA 1/0328/24.

Použitá literatúra

[1] Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., Stein, C., Basit, A., Chan, J. C. N., Mbanya, J. C., Pavkov, M. E., Ramachandaran, A., Wild, S. H., James, S., Herman, W. H., Zhang, P., Bommer, C., Kuo, S., Boyko, E. J., Magliano, D. J. 2022. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. Diabetes research and clinical practice, vol. 183, p. 109119.

[2] Garnett, K.E., Chapman, P., Chambers, J. A., Waddell I. D., Boam D.S.W. 2005. Differential gene expression between Zucker fatty rats and Zucker diabetic fatty rats: A potential role for the immediate-early gene Egr-1 in regulation of beta cell proliferation. Journal of Molecular Endocrinology. vol. 35, no. 1, pp. 13-25.

[3] Capcarová, M., Kalafova, A. 2019. Zucker Diabetic Fatty Rats for Research in Diabetes. Animal Models in Medicine and Biology, London, IntechOpen; 2019. pp 75-92. doi: 10.5772/intechopen.88161

[4] Israili, Z. H. 2011. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. American journal of therapeutics, vol. 18, no. 2, pp. 117–152.

[5] Constantini, S., Conte, C. 2019. Bone Health in Diabetes and Prediabetes. World J Diabetes, vol. 10, no. 8, pp. 421-445.

[6] Napoli, N., Chandran, M., Pierroz, D. D., Abrahamsen, B., Schwartz, A. V., Ferrari, S. L. 2016. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. Nature Reviews Endocrinology. vol. 13, no. 4, pp. 208–219.

[7] Conte, C., Bouillon, R., Napoli, N. (2020). Diabetes and bone. In book: Principle of Bone Biology. chapter 40, pp. 941-969. ISBN 978-0-12-81481-9.

[8] Lecka-Czernik, B. 2017. Diabetes, bone and glucose-lowering agents: basic biology. Diabetologia, vol. 60, no. 7, pp. 1163–1169.

[9] Mccreight, L.J., Bailey, C.J., Pearson, E.R. 2016. Metformin and the gastrointestinal tract. Diabetologia, vol. 59, no. 3, pp. 426–435.

[10] Blahová, J., Martiniakova, M., Babikova, M., Kovacova, V., Mondockova, V., Omelka, R. 2021. Pharmaceutical Drugs and Natural Therapeutic Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), vol. 14, no 8, p. 806. ISSN 1424-8247

[11] Hasanpour, D. A., Abbaszadeh, A., Mir, S., Hasanvand, A. 2019. Metformin and its anti-inflammatory and antioxidative effects; new concepts. J Renal Inj Prev. vol. 8, no.1, pp. 54-61.

[12] Omelka, R., Blahova, J., Kovacova, V., Babikova, M., Mondockova, V., Kalafova, A., Capcarova, M., Martiniakova, M. 2020. Cornelian Cherry Pulp Has Beneficial Impact on Dyslipidemia and Reduced Bone Quality in Zucker Diabetic Fatty Rats. Animals: an open access journal from MDPI, vol. 10, no. 12, p. 2435.

[13] Martiniakova, M., Blahova, J., Kovacova, V., Babikova, M., Mondockova, V., Kalafova, A., Capcarova, M., Omelka, R. 2021. Bee Bread Can Alleviate Lipid Abnormalities and Impaired Bone Morphology in Obese Zucker Diabetic Rats. Molecules (Basel, Switzerland), vol. 26, no. 9, p. 2616.

[14] Upadhyay, N. K., Yogendra Kumar, M.S., Gupta, A. 2010. Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) leaves. In: Food and Chemical Toxicology. 2010, vol. 48, no. 12, pp. 3443–3448. ISSN 0278-6915

[15] Suryakumar, G., Gupta, A. 2011. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.).In: Journal of Ethnopharmacology. 2011, vol. 138, no. 2, pp. 268–278. PMID: 21963559.

[16] Ciesarová, Z., Murkovic, M., Cejpek, K., Kreps, F., Tobolková, B., Koplík, R., Belajová, E., Kukurová, K., Daško, Ľ., Panovská, Z., Revenco, D., Burčová, Z. 2020. Why is sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) so exceptional? A review. In: Food Research International. 2020, vol. 133, 109170. PMID: 32466930.

[17] Zhang, W., Zhao, J., Wang, J., Pang, X., Zhuang, X., Zhu, X., & Qu, W. 2010. Hypoglycemic effect of aqueous extract of seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed residues in streptozotocin-induced diabetic rats. Phytotherapy research : PTR, vol. 24, no. 2, pp. 228–232.

[18] Chi, J. H., Shin, M. S., Lee, B. J. 2019. Identification of hypertriglyceridemia based on bone density, body fat mass, and anthropometry in a Korean population. BMC cardiovascular disorders, vol. 19, no. 1,p. 66.

[19] Dong, Y., Chen, Y.-T., Yang, Y.-X., Shou, D., Li, C-Y. 2016. Urinary Metabolomic Profiling in Zucker Diabeti Fatty Rats with Type 2 Diabetes Mellitus Treated with Glimepiride, Metformin and Their Combination. Moleculec. 2016, vol. 21, p. 1446.

[20] Sui, Y., Kong, X., Fan, R.,Ye, Y., Mai, H., Zhuo, S., Lu, W., Ruan, P., Fang, S., Yang, T. 2019. Long-term

treatment with metformin in the prevention of fatty livet in Zucker diavetic fatty rats. Diabetol Metab Syndr. 2019, vol. 11, p. 94.

[21] Dupak, R., Hrnkova, J., Simonova, N., Kovac, J., Ivanisova, E., Kalafova, A., Schneidgenova, M., Prnova, M. S., Brindza, J., Tokarova, K., Capcarova, M. 2022. The consumption of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) effectively alleviates type 2 diabetes symptoms in spontaneous diabetic rats. Research in veterinary science, vol. 152, pp. 261–269.

In silico štúdia unikátnych sekvenčno-štruktuktúrnych čŕt α-amylázovej rodiny GH126

In silico study of unique sequence-structural features of the α-amylase family GH126

Michaela Schorschová[1,2]
Školiteľ: Štefan Janeček[1,2]
[1]Ústav biológie a biotechnológie, Fakulta prírodných vied, UCM v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
[2]Laboratórium evolúcie proteínov, Ústav molekulárnej biológie SAV, v.v.i, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava
[1,2]schorschova1@ucm.sk, [1,2]Stefan.Janecek@savba.sk

Abstrakt
Rodina glykozidových hydroláz GH126 s potenciálnou α-amylázovou aktivitou je súčasťou CAZy klasifikácie. Doteraz bola známa len u baktérií a vyznačuje sa $(\alpha/\alpha)_6$-barelovou katalytickou doménou. Jej katalytické zvyšky a mechanizmus však neboli experimentálne potvrdené. Štruktúrna podobnosť s klanom GH-M (GH8 a GH48) môže viesť k nesprávnej klasifikácii hypotetických proteínov. Cieľom tejto štúdie bolo identifikovať unikátne sekvenčno-štruktúrne črty odlišujúce GH126 od GH8 a GH48. Porovnanie konzervovaných sekvenčných regiónov (KSR) odhalilo tyrozín v KSR-6 ako spoľahlivý marker. Práca priniesla aj rozšírenie rodiny GH126 o 71 sekvencií, a to nielen mimo kmeňa Bacillota, ale aj mimo ríše Bacteria. Analýza evolučných vzťahov poukázala na existenciu intermediátnych skupín proteínov, ktoré môžu byť dôležité pre štúdium evolučných trendov a aktivít týchto enzýmov.
Kľúčové slová: α-amylázová rodina GH126, katalytický $(\alpha/\alpha)_6$-barel, klan GH-M, unikátne sekvenčno-štruktúrne črty, konzervované sekvenčné regióny, evolučné vzťahy.

Abstract
The GH126 family of glycoside hydrolases, with potential α-amylase activity, is part of the CAZy classification. So far, it has been known only in bacteria and is characterized by an $(\alpha/\alpha)_6$-barrel catalytic domain. However, its catalytic residues and mechanism have not been experimentally confirmed. The structural similarity to the clan GH-M (GH8 and GH48) may lead to misclassification of the hypothetical proteins. This study aimed at identifying unique sequence-structural features distinguishing GH126 from GH8 and GH48. Comparison of conserved sequence regions (CSR) revealed tyrosine in CSR-6 as a reliable marker. The work also provided an expansion of the family GH126 by 71 sequences, not only outside the Bacillota phylum but also outside the Bacteria kingdom. Analysis of evolutionary relationships revealed the existence of intermediate groups of proteins that can be important for studying these enzymes' evolutionary trends and activities
Key Words: α-Amylase family GH126, Catalytic $(\alpha/\alpha)_6$-barrel, clan GH-M, Unique sequence-structural features, Conserved sequence regions, Evolutionary relationships

Úvod
Sekvenčná klasifikácia rodín enzýmov aktívnych voči sacharidom, založená na základe podobnosti aminokyselinových sekvencií, bola navrhnutá s cieľom uľahčiť získavanie informácií o štruktúrach a funkciách týchto proteínov. Tento klasifikačný systém, známy ako databáza CAZy (http://www.cazy.org;, [1]), je dostupný on-line od roku 1998 a obsahuje genómové, štruktúrne a biochemické informácie o ich katalytických a sacharidovo-viažucich moduloch [1].

Katalytické moduly sú rozdelené do piatich hlavných skupín na základe katalyzovanej reakcie: (i) glykozidové hydrolázy (GH), (ii) glykozylové transferázy (GT), (iii) polysacharidové lyázy (PL), (iv) sacharidové esterázy (CE), (v) pomocné redoxné enzýmy (AA) [1].

Glykozidové hydrolázy (GH, EC 3.2.1.-) predstavujú rozsiahlu skupinu enzýmov s katalytickými doménami rozdelenými do 187 GH rodín. Na vyššej hierarchickej úrovni sú niektoré z týchto rodín spojené do 18 klanov. Enzýmy v rovnakom klane majú spoločný evolučný pôvod a zdieľajú dôležité funkčné charakteristiky, vrátane architektúry aktívneho miesta, katalytickej mašinérie, sekvenčnej podobnosti, anomérnej konformácie štiepených glykozidových väzieb a mechanizmu reakcie [1].

Rodina GH126 je súčasťou klasifikácie GH v CAZy databáze ako poteniálna α-amylázová rodina [2]. Bola etablovaná v roku 2011 na základe čiastočnej charakterizácie a vyriešenia terciárnej štruktúry amylolytického enzýmu CPF_2247 z genómu *Clostridium perfringens* [3]. Do tejto rodiny je momentálne klasifikovaných približne 1700 bakteriálnych sekvencií, pričom majoritné zastúpenie je z fylogenetického kmeňa Bacillota [1]. Z dvoch vyriešených štruktúr enzýmov z rodiny GH126 – „α-amyláza" CPF_2247 [3] a proteín PssZ z *Listeria monocytogenes* [4] (kódy PBD: 3REN, resp. 6R2M) – je známe, že katalytickú doménu tvorí (α/α)6-barel, ktorý u ostatných α-amylázových rodín doteraz pozorovaný nebol [5]; je to ale napr. typická katalytická doména glukoamyláz z rodiny GH15 [6]. Terciárna štruktúra a predpokladané aktívne miesto členov rodiny GH126 sú podobné invertujúcim β-glukanázam z rodín GH8 a GH48 [3], ktoré spolu tvoria klan GH-M [1]. Ako najbližšie štruktúrne homológy pre amylolytický enzým CPF_2247 z *Clostridium perfringens* boli popísané dve β-glukán-aktívne glukozidázy [3] – endoglukanáza CelA z *Clostridium thermocellum* (kód PDB: 1KWF) z rodiny GH8 [7] a celobiohydroláza CelS (kód PDB: 1L2A) z tej istej baktérie z rodiny GH48 [8]. Pre obe rodiny klanu GH-M je síce charakteristická $(\alpha/\alpha)_6$-barelová katalytická doména, avšak pri hydrolýze uplatňujú invertujúci reakčný mechanizmus [1,7,8], čo je priamo v kontradikcii s definíciou α-amylázy ako enzýmovej špecificity [2,5].

Doteraz vykonané bioinformatické analýzy identifikovali sedem konzervovaných sekvenčných regiónov (KSR) v rodine GH126 a rozšírili jej taxonomické spektrum o zástupcov mimo kmeňa Bacillota [9,10]. Bola tiež naznačená možná evolučnú príbuznosť s rodinou α-manannáz z rodiny GH76 využivajúce retenujúci reakčný mechanizmus, čo podporuje hypotézu, že enzým CPF_2247 z *Clostridium perfringens* môže byť α-amyláza [9].

Cieľom predkladanej práce bola detailná *in silico* analýza rodiny GH126 s cieľom identifikovať unikátne sekvenčno-štruktúrne črty umožňujúce jej jednoznačné odlíšenie od podobných β-glukanázových rodín GH8 a GH48 z klanu GH-M. Za týmto cieľom bol zostavený aktuálny a reprezentatívny súbor sekvencií pre rodinu GH126, ako aj súbory sekvencií zástupcov rodín GH8 a GH48. Ďalším cieľom bola identifikácia evolučne príbuzných sekvencií, ktoré by rozširovali rodinu GH126 nielen mimo kmeňa Bacillota, ale aj mimo baktérií.

1 Materiály a metódy

Na tvorbu študovaných súborov pre rodiny GH126, GH8 a GH48 boli využité informácie z databázy CAZy [1]. Sekvencie sme získali zo sekvenčných databáz GenBank [11] a UniProt [12].

Pre rodinu GH126 bol zozbieraný súbor pozostávajúci z 1511 sekvencií, ktoré boli klasifikované v databáze CAZy (aktualizácia z 13.12.2022). Tieto sekvencie boli na začiatku zrovnané pomocou programu Clustal-Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/; [13]) a následne spracované pomocou softvéru AliView [14]. V zrovnaní bolo identifikovaných sedem KSR definovaných pre rodinu GH126 [9] a predpokladané aminokyselinové zvyšky aktívneho miesta [3]. Na ich základe bolo zrovnanie mierne manuálne upravené v regiónoch KSR-2 a KSR-4. Následne bolo zo súboru vylúčených 36 sekvencií, ktoré nespĺňali všetky tri požadované kritériá: (i) kompletná dĺžka katalytickej $(\alpha/\alpha)_6$-barelovej domény; (ii) úplná sekvencia v oblastiach siedmych KSR; a (iii) konzervované všetky zvyšky potenciálne zapojené do aktívneho miesta (predpokladaná katalytická mašinéria). Pre súbor 1475 sekvencií bolo vytvorené reprezentatívne sekvenčné logo pomocou nástroja WebLogo3 (https://weblogo.threeplusone.com/; [15]).

Súbor 1511 sekvencií z rodiny GH126 sme ďalej spracovali na základe sekvenčnej identity, kde bol zvolený limit 90%. Bolo identifikovaných 74 sekvenčných klastrov obsahujúcich viac ako jednu sekvenciu, pre ktoré sme zvolili jednu sekvenciu reprezentujúcu celý klaster. Tieto sekvencie sme označili ako master ("M"). Rovnako bolo identifikovaných 104 sekvencií, ktoré nezdieľali sekvenčnú identitu vyššiu ako 90% so žiadnou inou sekvenciou v súbore. Tieto sekvencie boli označené ako unique ("U"). Reprezentatívny súbor sekvencií pre celú rodinu GH126 obsahoval 187 sekvencií. Pre študovaný súbor sa uskutočnila fylogenetická analýza s dôrazom na taxonomické rozdelenie členov rodiny GH126. Fylogenetická analýza zahŕňala aj zrovnanie katalytických domén pomocou programu Clustal-Omega [13], jeho manuálnu úpravu a následné zostrojenie fylogenetického stromu využitím metódy Maximum Likelihood v programe MEGA X [16].

Súbory študovaných sekvencií pre rodiny GH8 a GH48 boli vytvorené na základe záznamov z databázy CAZy [1] so známou štruktúrou alebo špecificitou, tj. experimentálne charakterizovaní členovia oboch rodín, aby mohli byť porovnané sekvenčno-štruktúrne vlastnosti s rodinou GH126. Pre rodinu GH8 bol

vytvorený súbor obsahujúci 87 sekvencií. V prípade rodiny GH48 bol súbor obohatený o sekvencie eukaryotického pôvodu, čím bol dosiahnutý celkový počet 65 sekvencií. Pre tieto sekvencie boli identifikované korešpondujúce regióny s KSR identifikovanými pre rodinu GH126 [9] a správne určenie týchto regiónov bolo následne potvrdené porovnaním terciárnych štruktúr enzýmov CelA (kód PDB: 1KWF; [7]) z rodiny GH8 a CelS (kód PDB: 1L2A; [8]) z rodiny GH48. Pre identifikované KSR boli vytvorené ich sekvenčné logá pomocou nástroja WebLogo3 (https://weblogo.threeplusone.com/; [15]).

V snahe identifikovať možných členov rodiny GH126 mimo kmeňa Bacillota bol využitý nástroj pBLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/; [17]). Vyhľadávanie bolo zamerané na všetky taxóny s výnimkou Bacillota a zamerané aj na Archaea a Eukarya, pričom ako záujmové sekvencie boli použité sekvencie enzýmov z rodiny GH126: (i) amylolytický enzým CPF_2247 z *C. perfringens* (GenBank: ABG82272.1); a (ii) enzým PssZ z *L. monocytogenes* (GenBank: AGR24185.1); (iii) hypotetický proteín z *Brevibacterium* sp. JNUCC-42 (GenBank: QOS97782.1); (iv) hypotetický proteín z *Kurthia* sp. 11kri321 (GenBank: AMA62669.1). Analýzou pomocou programu pBLAST [17] bolo zachytených celkovo 116 sekvencií mimo kmeňa Bacillota. Z tohto počtu bolo zaznamenaných: (i) 22 neúplných sekvencií; (ii) 23 sekvencií nesúcich sekvenčné črty rodiny GH8; (iii) 48 sekvencií so všetkými sekvenčnými črtami rodiny GH126; (iv) 23 sekvencií, ktoré nevykazovali všetky črty rodiny GH126, avšak nebolo možné ich jednoznačne priradiť ani k rodinám GH8 a GH48.

Na objasnenie evolučných vzťahov medzi rodinami GH126, GH8, GH48 a 71 sekvenciami získanými pomocou nástroja pBLAST [17], ktoré mali znaky rodiny GH126 sme vykonali fylogenetickú analýzu. Katalytické domény všetkých študovaných sekvencií boli zrovnané pomocou programu Clustal-Omega [13] s potrebou manuálnej úpravy. Fylogenetický strom bol pripravený pomocou metódy Maximum Likelihood v programe MEGA X [16].

2 Výsledky a diskusia

Predošlé štúdie poukázali na štruktúrnu podobnosť medzi amylolytickými enzýmami z rodiny GH126 a invertujúcimi β-glukanázami z rodín GH8 a GH48. Aj napriek nízkej sekvenčnej identite enzýmy týchto rodín zdieľajú spoločné pravdepodobné zvyšky katalytickej mašinérie, čo naznačuje ich možné evolučné prepojenie [3, 9].

Príklad enzýmu PssZ z *L. monocytogenes* podporuje túto podobnosť. Pôvodne bol na základe kryštálovej štruktúry a sekvenčnej analýzy klasifikovaný do rodiny GH8 [4]. Však kurátori databázy CAZy zaradili do rodiny GH126, nakoľko spĺňa všetky jej charakteristiky [9]. Tento prípad poukazuje na potrebu identifikácie sekvenčno-štrukturných čŕt, ktoré by umožnili jasnejšiu klasifikáciu nových hypotetických proteínov a lepšie porozumenie ich funkcií a vzťahov.

V predloženej bioinformatickej analýze sa usilujeme o identifikáciu čŕt, ktoré by odlišovali tieto GH rodiny. Bola uskutočnená detailná *in silico* analýza rodiny GH126, pre ktorú bol vytvorený súbor sekvencií reprezentujúci všetky záznamy sekvencií z databázy CAZy podľa jej aktualizácie z 13. decembra 2022 [1].

Pre súbor obsahujúci 1475 sekvencií bolo zostavené sekvenčné logo pre sedem KSR. Na rozdiel od loga pre KSR z práce Kerenyiová a Janeček [9], logo vytvorené v tejto práci obsahuje 13 násobne viac sekvencií, čím sa zvýšila jeho výpovedná hodnota potrebná pre identifikáciu unikátnych sekvenčno-štruktúrnych čŕt. Aktualizované sekvenčné logo sa líšilo najmä pomerom zastúpenia niektorých variabilnejších zvyškov v KSR-2, KSR-4 a KSR-7, pričom päť aminokyselinových zvyškov si zachovalo svoju invariantnosť: (i) E843 v KSR-1; (ii) D136 v KSR-3; (iii) R139 v KSR-3; (iv) Y194 v KSR-5; (v) Y307 v KSR-6 (číslované podľa CPF_2247 z *C. perfringens*; GenBank: ABG82272.1).

Na zachovanie reprezentatívnosti súboru sme celkový súbor 1511 sekvencií rozdelili do klastrov na základe sekvenčnej identity, pričom sme vytvorili komplexný súbor 178 sekvencií zastupujúcich celú rodinu GH126. Pre tento súbor bola uskutočnená fylogenetická analýza s dôrazom na taxonomické rozdelenie členov rodiny GH126. Výsledky potvrdzujú *in silico* analýzu, v ktorej boli zástupcovia tejto rodiny členmi ríše Bacteria, pričom väčšina patrila do kmeňa Bacillota [10]. Výnimočným pozorovaním bolo identifikovanie jedného zástupcu GH126 z kmeňa Actinomycetota. Zároveň na taxonomickej úrovni bola zaznamenaná prítomnosť 4 tried, 6 radov a 15 čeľadí.

S cieľom porovnať sekvenčno-štruktúrne črty rodiny GH126 s rodinami GH8 a GH48 boli vytvorené súbory študovaných sekvencií pre tieto GH rodiny. Sekvencie boli vybraté z databázy CAZy na základe známej štruktúry alebo špecificity. Pre tieto sekvencie boli identifikované korešpondujúce regióny s KSR identifikovanými pre rodinu GH126 [9]. Správne určenie regiónov sme následne potvrdili porovnaním terciárnych štruktúr.

Analýza KSR pre všetky tri rodiny ukázala, že KSR sú konzervovanejšie v rodinách GH126 a GH48 v porovnaní s rodinou GH8, kde bola zaznamenaná vyššia variabilita. V analýze bolo identifikovaných päť konzervovaných zvyškov v rodine GH126, pričom dva zvyšky boli konzervované aj v sekvenciách klanu GH-M (E843 v KSR-1 a D136 v KSR-3, ktoré pravdepodobne plnia katalytickú funkciu). Rodina GH126 zdieľa ďalšie dva konzervované zvyšky len s rodinou GH48 (R139 v KSR-3 a Y194 v KSR-5). Zvlášť zaujímavé bolo zistenie, že pozícia zvyšku Y307 v KSR-6 sa vyskytuje len v rodine GH126, pričom v rodinách klanu GH-M je na tejto pozícii najčastejším zvyškom alanín.

S cieľom identifikovať potenciálnych členov rodiny GH126 mimo kmeňa Bacillota sme uskutočnili analýzu využívajúcu nástroj pBLAST [17]. Zo 116 identifikovaných sekvencií bolo selektovaných 71, ktoré vykazovali črty členov rodiny GH126. V súbore prevláda väčšina proteínov patriacich do ríše Bacteria, s dvomi proteínmi identifikovanými v rámci Fungi a štyrmi v rámci Archaea. Týmto prístupom sme efektívne rozšírili počet známych členov rodiny GH126 aj mimo Bacteria, čo prináša nový pohľad na jej potenciálnu distribúciu v rôznych taxonomických skupinách.

Analýza evolučných vzťahov pre rodiny GH126, GH8, GH48 a nových potenciálnych zástupcov rodiny GH126 odhalila jednoznačné rozdelenie sekvencií do príslušných rodín. Avšak vznikli dve skupiny sekvencií, ktoré sa oddelili od hlavnej vetvy rodiny GH126 a nezapadajú ani do klanu GH-M. Tieto proteíny pravdepodobne môžu predstavovať skupinu s intermediátnym charakterom, ktorá môže mať význam v kontexte evolučného vývoja a funkcie týchto proteínov.

Záver

Predložená komplexná *in silico* analýza rodiny GH126 prispela k identifikácii sekvenčno-štruktúrnych čŕt, ktoré možno využiť ako selekčné markery pre túto rodinu. Kľúčovým poznatkom je, že pozícia Y307 v KSR-6 je unikátna pre rodinu GH126 a umožňuje jednoznačné odlíšenie sekvencií v tejto rodine. Týmto spôsobom je možné jednoznačne klasifikovať hypotetické proteíny do príslušných rodín. Okrem toho sme prispeli taxonomickým rozšírením rodiny GH126 do ríše Eukarya a Archaea keďže doteraz boli ako členovia rodiny GH126 známe len sekvencie bakteriálneho pôvodu. Analýza evolučných vzťahov odhalila potenciálne intermediátne skupiny proteínov. Tieto skupiny môžu byť kľúčovými pre objasnenie evolučných trendov a biologických funkcií týchto enzýmov.

Poďakovanie

Tento výskum bol finančne podporený grantom Fakulty prírodných vied UCM v Trnave č. FPV10-2023 a grantom č. 2/0146/21 od Slovenskej grantovej agentúry VEGA.

Použitá literatúra

[1] DRULA, E. – GARRON, M.L. – DOGAN, S. – LOMBARD, V. – HENRISSAT, B. – TERRAPON, N., 2022. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. In *Nucleic Acids Research*. roč. 50, č. D1, s. D571–D577. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045.

[2] JANECEK, S. – SVENSSON, B., 2022. How many α-amylase GH families are there in the CAZy database? In *Amylase*. roč. 6, č. 1, s. 1–10. https://doi.org/10.1515/amylase-2022-0001.

[3] FICKO-BLEAN, E. – STUART, C.P. – BORASTON, A.B., 2011. Structural analysis of CPF-2247, a novel α-amylase from *Clostridium perfringens*. In *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. roč. 79, č. 10, s. 2771–2777. https://doi.org/10.1002/prot.23116.

[4] WU, H – QIAO, S. – LI, D. – GUO, L. – ZHU, M. – MA, L.Z., 2019. Crystal structure of the glycoside hydrolase PssZ from *Listeria monocytogenes*. In *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*. roč. 75, č. 7, s. 501–506. https://doi.org/10.1107/S2053230X19008100.

[5] JANECEK, S. – SVENSSON, B. – MACGREGOR, E. A., 2014. Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. In *Cellular and Molecular Life Sciences*. roč. 71, č. 7, s. 1149–70. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1388-z.

[6] SAUER, J. – SIGURSKJOLD, B. – CHRISTENSEN, U. – FRANDSEN, T.P. – MIRGORODSKAYA, E. – HARRISON, M. – ROEPSTORFF, P. – SVENSSON, B., 2000. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. In *Biochimica et Biophysica Acta*. roč. 1543, č. 2, s. 275–293. https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00232-6.

[7] GUERIN, DM. - LASCOMBE, M.B. – COSTABEL, M – SOUCHON, H. – LAMZIN, V. – BEGUIN, P. – ALZARI, P.M., 2002. Atomic (0.94 Å) resolution structure of an inverting glycosidase in complex with substrate. In *Journal of Molecular Biology*. roč. 316, č. 5, s. 1061–1069. https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5404.

[8] GUIMARAES, B.G. – SOUCHON, H. – LYTLE, B.L. – DAVID, WU, J.H. – ALZARI, P.M., 2002. The crystal structure and catalytic mechanism of cellobiohydrolase

CelS, the major enzymatic component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. In *Journal of Molecular Biology*. roč. 320, č. 3, s. 587–596. https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00497-7.
[9] KERENYIOVA, L. – JANECEK, S., 2020. A detailed *in silico* analysis of the amylolytic family GH126 and its possible relatedness to family GH76. In *Carbohydrate Research*. roč. 494, 108082. https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108082.
[10] KERENYIOVA, L. – JANECEK, S., 2020. Extension of the taxonomic coverage of the family GH126 outside Firmicutes and *in silico* characterization of its non-catalytic terminal domains. In *3 Biotech*. roč. 10, č. 10, 420. https://doi.org/10.1007/s13205-020-02415-x.
[11] SAYERS, E.W. – CAVANAUGH, M. – CLARK, K. – PRUITT, K.D. – SCHOCH, C.L. – SHERRY, S.T. - KARSCH-MIZRACHI, I., 2021. GenBank. In *Nucleic Acids Research*. roč. 49, č. D1, s. D92–D96. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1023.
[12] UniProt Consortium. 2021. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. In *Nucleic Acids Research*. roč. 49, č. D1, s. D480–D489. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100.
[13] SIEVERS, F. – WILM, A. – DINEEN, D. – GIBSON, T.J. – KARPLUS, K. – LI, W. – LOPEZ, R. – MCWILLIAM, H. – REMMERT, M. – SÖDING, J. – THOMPSON, J.D. – HIGGINS, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. In *Molecular System Biology*. roč. 7, 539. https://doi.org/10.1038/msb.2011.75.
[14] LARSSON, A., 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. In *Bioinformatics*. roč. 30, č. 22, s. 3276–3278. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531.
[15] CROOKS, G.E. – HON, G. – CHANDONIA, J.M. – BRENNER, S.E., 2004. WebLogo: a sequence logo generator. In *Genome Research*. roč. 14, č. 6, s. 1188–1190. https://doi.org/10.1101/gr.849004.
[16] KUMAR, S. - STECHER, G. - LI, M. - KNYAZ, C. - TAMURA, K., 2018. *MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms*. In *Molecular Biology and Evolution*. roč 35, č. 6, s. 1547-1549. http://doi.org/10.1093/molobev/msy096
[17] ALTSCHUL, S.F. – GISH, W. – MILLER, W. – MYERS, E.W. – LIPMAN, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. In *Journal of Molecular Biology*. roč. 215, č. 3, s. 403–410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Magnetické pole ako dočasný environmentálny stresor

Magnetic field as temporary environmental stressor

Miroslava Sinčák[1], Miroslav Šmelko[2], Pavol Lipovský[2], Milan Oravec[3], Miloslav Lupták[4], Petr Jandačka[5], Alena Luptáková[6], Jana Sedlaková-Kaduková[1]*

[1]Ústav chémie a environmentálnych vied, Prírodovedecká fakulta Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Nám. J. Herdu 2, Trnava, 917 01, Slovensko
[2]Letecká fakulta, Technická univerzita v Košiciach, Letná 9, Košice. 042 00, Slovensko
[3]Strojnícka fakulta, Technická univerzita v Košiciach, Letná 9, Košice. 042 00, Slovensko
[4] Fakulta materiálov, metalurgie a recyklácie, Technická univerzita v Košiciach, Letná 9, 04200, Košice, Slovensko
[5]Česká zemědělská univerzita v Prahe, Fakulta lesníckych a drevárskych vied, Kamycká 129, 16500 Praha 6 – Suchdol, Česká republika
[6]Slovenská akadémia vied, Ústav geotechniky, Watsonova 45, 04001 Košice, Slovensko
[1] sincak1@ucm.sk, [1*] jana.sedlakova.fpv@ucm.sk

Abstrakt

Magnetické polia rôznej sily a frekvencie sú neoddeliteľnou súčasťou dnešného sveta, a organizmy ho môžu vnímať na viacerých úrovniach, no ich mechanizmus a rozsah efektov je stále nejednoznačný. V našej práci sme skúmali vplyv teoretického (50 Hz) a reálne nameraného urbánneho elektromagnetického poľa (50:150 Hz) na rast, prežívanie a UV toleranciu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Po vystavení kvasiniek testovaným poliam sme pozorovali oneskorený nástup exponenciálnej fázy rastu o približne 17 hodín. UV tolerancia zostala nezmenná, no po vystavení UV žiareniu sme u kvasiniek pozorovali prekvapivú tvorbu mostíkových útvarov, ktorá bola zosilnená elektromagnetickým poľom. Naše výsledky ukazujú, že skúmané elektromagnetické pole nebolo dostatočne silné, aby spôsobilo viditeľné rastové zmeny, ale aj tak bolo kvasinkami zaregistrované, čo vyústilo v oneskorený nástup stacionárnej fázy sa zvýšenou tvorbou mostíkových útvarov.

Kľúčové slová: kvasinky, magnetizmus, UV-tolerancia

Abstract

Various strength and frequency magnetic fields are an integral part of today's world, and organisms can perceive them at multiple levels, but their mechanisms, but their mechanisms and the extent of their effects remain ambiguous. In our study, we examined the impact of theoretical (50 Hz) and real measured urban electromagnetic fields (50:150 Hz) on the growth, survival, and UV tolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. After exposing the yeast to the tested fields, we observed a delayed onset of the exponential growth phase by approximately 17 hours. UV tolerance remained unchanged, but we observed surprising bridge structure formations after exposure to UV radiation, which were enhanced by the electromagnetic field. Our results indicate that the investigated electromagnetic field was not strong enough to cause visible growth changes, yet it was still detected by the yeast, resulting in a delayed onset of the stationary phase with an increased number of formed bridge structures.

Keywords: yeast, magnetism, UV tolerance

Úvod

V procese evolúcie bolo zemské magnetické pole ($B_g \approx$ 50 μT) stálym abiotickým faktorom a všetky organizmy sa mu viac alebo menej prispôsobili. Ako príklad môžeme uviesť migráciu vtákov a rýb, ale tiež magnetiorecepciu baktérií, ktoré sú si schopné do svojej bunky ukladať magnetické čiastočky využívajúc ich na orientáciu [1]. Biologické systémy sa ale v dnešnej dobe stretávajú aj s inými poľami, ako s tým prirodzeným, geomagnetickým. Urbánne elektromagnetické polia, pohybujúce sa v rozmedzí od nízkych frekvencií (0 až 50 Hz) až po vysokofrekvenčné GHz (bezdrôtová sieť LAN) sú v civilizovanom svete všadeprítomné a organizmy ich môžu detegovať na viacerých úrovniach [2].

Magnetické pole nemusí vplývať na organizmus ako celok, ale iba na jednu jeho časť známu, ako cieľ magnetického poľa [3]. Ovplyvnenie orgánu, tkaniva,

alebo len funkcie jedného enzýmu, môže mať za následok výrazné zmeny životných funkcií celého organizmu [4]. Účinok magnetických polí na rôzne eukaryotické organizmy je súčasťou predklinického výskumu najmä na tkanivových kultúrach či myšiach a potkanoch s cieľom popísať dôsledky a mechanizmy magnetorecepcie [5,6].

Práve kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, ako všeobecne široko využívaný modelový organizmus, bola viac krát skúmaná vzhľadom k jej schopnosti detegovať prítomnosť externých magnetických a elektromagnetických polí [710]. Často-krát boli skúmané veľmi silné magnetické polia (100 – 300 mT) generované magnetom, či slabé polia s frekvenciu 50 alebo 150 Hz typické pre urbánne prostredie [8,9]. Výrazné účinky magnetických polí na rast, proliferáciu, fermentáciu či aktivitu vybraných enzýmov boli pozorované zväčša pri silnejších poliach (20 - 100mT) [10]. Niektorí autori tiež opisujú vplyv magnetického poľa ako environmentálneho stresora a jeho súvis s produkciou reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a antioxidačných enzýmov [11]. Napriek širokému uplatneniu kvasinky vo výskume magnetorecepcie, nebolo doteraz popísané či sa pri procese magnetorecepcie uplatňuje aj adaptívna stresová reakcia uplatňuje a dočasne tak zvyšuje toleranciu voči iným environmentálnym stresorom.

Existujú štúdie skúmajúce iné organizmy, ktoré naznačujú, že magnetické pole môže pomocou adaptívnej stresovej reakcie zvyšovať toleranciu organizmov voči iným environmentálnym stresorom, napr. u niektorých rastlín voči toxickým kovov v pôde [11], prípadnej voči UV žiareniu [12]. Táto adaptácia môže byť spôsobená aktiváciou rôznych metabolických ciest, ktoré dočasne zvyšujú odolnosť organizmu, a tým sa mu pomáhajú lepšie vyrovnať aj s prípadným ďalším environmentálnym stresorom [13]. Tento jav má široké implikácie pre biologické systémy, pretože umožňuje organizmom lepšie zvládať zmeny v ich prostredí a prežiť za rôznych podmienok [14,15]. Ďalšie výskumy v tejto oblasti by mohli poskytnúť hlbší pohľad do mechanizmov, cez ktoré magnetické pole ovplyvňuje adaptáciu organizmov na environmentálny stres a posilňuje ich schopnosť zvládať nepriaznivé podmienky.

Uvedené štúdie sa primárne zameriavali na silné magnetické polia, ktoré sa zriedka vyskytujú v typických antropogénnych prostrediach. To je v kontraste so slabými magnetickými poľami (<0,5 mT) so sinusoidálnou vlnovou fukciou a frekvenciami 50 alebo 150 Hz, ktoré sú teoreticky indukované bežnými elektrickými spotrebičmi. Na základe meraní sme zaznamenali, že reálne urbánne elektromagnetické pole zahŕňa často nielen priemyselnú frekvenciu 50 Hz, ale aj jej dominantné harmonické frekvencie (150 Hz) a to v pomere 4:1.

Cieľom našej štúdie bolo testovať vplyv teoretického (50 Hz, 150Hz) a reálneho urbánneho (50:150, 4:1) elektromagnetického poľa na rast, prežívanie a prípadné dočasné zvýšenie tolerancie voči UV žiareniu ako odpoveďou organizmu na prítomnosť externého elektromagnetického poľa.

1.Materiál a metodika

V tejto časti si opíšeme použitý materiál a metódy, ktoré sme použili pri spracovaní materiálu pre potreby výskumu.

1.1.Modelový organizmus

Na skúmanie účinku magnetických polí sme použili kvasinkovú kultúru *Saccharomyces cerevisiae* zo zbierky Chemického ústavu SAV v Bratislave (CCY 21-4-13, liehovarnícka kultúra). Kultúru kvasiniek sme udržiavali na MD agarovom tuhom médiu (štandardné zloženie média: YNB (10×), dextróza (20%), biotín (0.02%), agar (2%)). Počas experimentov sme ako kultivačné médium používali tekuté YPD médium so štandardným zložením (kvasinkový extrakt 1%, peptón 2%, dextróza 2%).

1.2 Indukcia magnetického poľa

Magnetické pole bolo vytvárané pomocou systému pozostávajúceho z generátora elektrického poľa cievky. Na účely tohto experimentu bola zhotovená medená kruhovitá cievka, ktorá pozostávala z dvoch vinutí, medzi ktorými bolo po obvode 6 otvorov na umiestnenie skúmaviek so vzorkami (Obrázok 1). Testovaná kultúra bola vystavená elektromagnetickému poľu s frekvenciou 50Hz, a kombináciou frekvencií 50:150Hz (4:1), s hustotou elektromagnetického toku (B) 0,1 mT. Celá aparatúra bola zostavená v rámci spolupráce s Leteckou fakultou Technickej Univerzity v Košiciach.



Obrázok 1 Medená kruhovitá cievka so šiestimi skúmavkami v priebehu experimentu

1.3 Experimentálny dizajn

Malé množstvo kvasinkovej kultúry sme preniesli do 120 ml sterilného YPD média ochladeného na izbovú teplotu a následne sme kultivovali po dobu 2 hodín. Po tejto pred-kultivácii nasledovala experimentálna kultivácia, kedy sme kultúru rozdelili na 6 vzoriek a 6 kontrolných kultúr po 10 ml. Takto pripravenú kultúru sme vystavili testovanému magnetickému poľu po dobu 24 h (vzorky) alebo ponechali v laboratórnych podmienkach, iba pod vplyvom geomagnetického poľa Zeme (kontrola) (Tab.1). Po skončení kultivácie v magnetickom poli, sme pokračovali v kultivácií ďalších 24 hodín v laboratórnych podmienkach na overenie stability prípadných zmien. Magnetické pole v laboratóriu sa pohybovalo medzi 50 - 51 µT s fluktuáciami 10 - 100 nT.

Tabuľka 1 Označenie elektromagnetických polí testovaných v tejto štúdii

označenie	definícia
M50	Statické magnetické pole (sínusový priebeh, f = 50Hz, amplitúda = 20 µT (6,26mA)
M50/150	Statické magnetické pole (sínusový priebeh, f = 50Hz a 150Hz, pomer medzi harmonickými zložkami 4:1, amplitúda = 20 µT (6,26mA)
kontrola	Laboratórne podmienky, geomagnetické pole Zeme (50 µT)

1.4 Merané parametre

Zmeny počtu buniek vyhodnotené pomocou spektrofotometrickej analýzy (Shimadzu, UV-1900i, Japan) a životaschopnosť kvasiniek, vyhodnotená pomocou počítania CFU boli merané v pravidelných intervaloch. Rezistencia kvasiniek voči UV žiareniu bola vyhodnotená vystavením kultúry na Petriho miskách (MD agar, laboratórne podmienky) UV žiareniu pod UV lampou (RAYCOP OMNI AIR UV lampa) po dobu 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 sekúnd, po 24 hodinách experimentálnej kultivácie v testovaných magnetických poliach. UV žiarenie dopadalo kolmo na povrch čerstvo naočkovanej kultúry, 25 cm od zdroja žiarenia. Merania sme uskutočnili v triplikátoch.

2 Výsledky a diskusia

V tejto časti si rozoberieme dosiahnuté výsledky výskumu a porovnáme ich so stanoveným cieľom.

2.1. Rast a Proliferácia

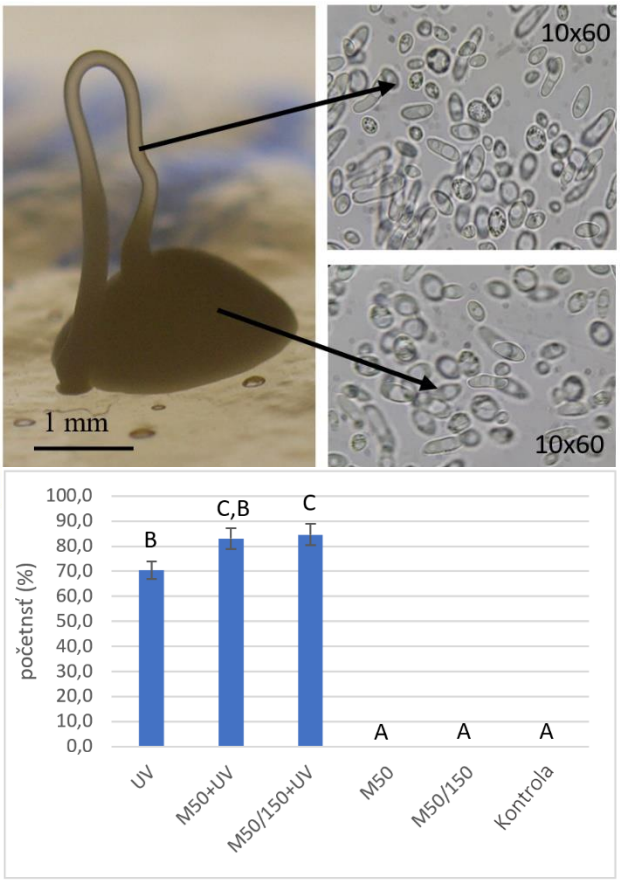
Počas expozície magnetickému poľu (M50 alebo M50/150) sme zaznamenali len malé a štatisticky nevýznamné zmeny v rýchlosti rastu, počte CFU/ml a počte pučiacich buniek. Jedinou významnou zmenou bolo oneskorenie začiatku stacionárnej fázy rastu po expozícii len reálnemu elektromagnetickému poľu (M50/150) na rozdiel od teoretického urbánneho poľa (50Hz). Po expozícii magnetickému poľu nastala oneskorená fáza stacionárneho rastu o 17 hodín.

Podobné výsledky boli zaznamenali len v dvoch štúdiách [12, 15], ktorých autori predpokladali, že toto oneskorenie je spôsobené tým, že magnetické pole zapríčinilo odumretie určitej časti populácie kvasiniek, zatiaľ čo zvyšné bunky sa prispôsobili zmeneným magnetickým podmienkam. V našej štúdii sa nám tieto vysvetlenia javia menej pravdepodobné, keďže sme nezaznamenali významné zníženie počtu životaschopných buniek počas prvých hodín kultivácie. Pravdepodobnejšie sa nám javí vysvetlenie od autorského kolektívu Colenam a kol. [16], ktorí pozorovali že expozícia elektromagnetickému poľu (120 µT, 50 Hz) ovplyvnila kinetiku bunkového cyklu, spojenú s opravou DNA a adaptačným procesom na nové podmienky prostredia.

Podľa nášho predpokladu slabé, nízkofrekvenčné polia nie sú dostatočne silné na to, aby spôsobili významnú stimuláciu alebo inhibíciu rastu. Predpokladáme, že kvasinkové bunky detegovali zmenu v externom magnetickom poli, čo viedlo k pomalšiemu postupu cez rastové fázy, keď sa prispôsobovali tomuto novému poľu.

2.2. 1. UV-tolerancie a tvorba mostíkových útvarov

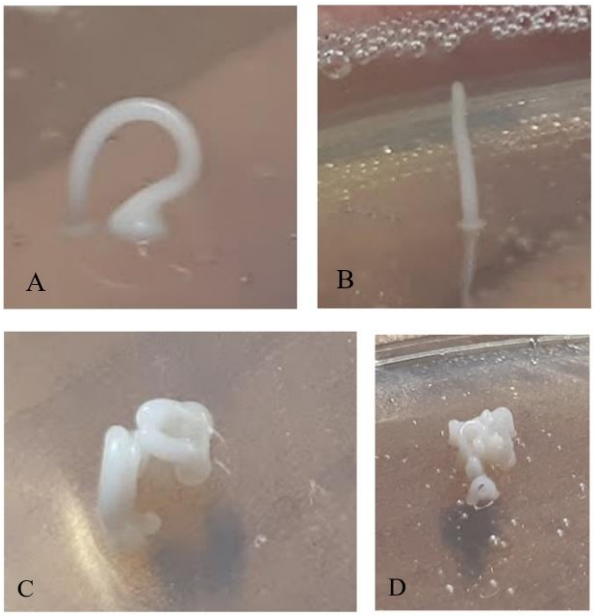
Po vystavení kultúry kvasiniek magnetickému poľu sme nezaznamenali žiadne zmeny v tolerancii voči UV žiareniu v prípade vzoriek či kontroly. UV žiarenie počas 30 sekúnd bolo inhibičné pre všetky testované kultúry. Po vystavení UV žiareniu počas 20 sekúnd sme však pozorovali vytvorenie neobvyklých mostíkových kolónií vo všetkých kvasinkových kultúrach (vzorky a kontrola). Vytvorenie takýchto kolónií bolo významne stimulované kombináciou magnetického poľa a UV žiarenia (M50/150 + UV) (Obr. 2)



Obrázok 2: Tvorba mostíkových kolónií kvasiniek na 2,5% agarovom médiu, ich morfológia sledovaná pomocou svetelného mikroskopu (zväčšenie 10 x 60), a relatívny počet mostíkových kolónií Skupiny A, B, C sú signifikantne odlišné podľa ANOVA testu ($p < 0,05$).

*UV: iba UV žiarenie (20 sekúnd)
M50+UV/ M50/150+UV: kombinácia UV žiarenia (30 sekúnd) a príslušného elektromagnetického poľa (po dobu 24 hodín)
M50/M50/150: iba testované elektromagnetické pole po dobu 24 hodín
Kontrola: laboratórne podmienky

Naše výsledky sú v rozpore zo zisteniami ojedinelej štúdie Markennen a kol. [4], ktorá dokumente inhibíciu rastu a poškodenie DNA spôsobené kombináciou UV žiarenia po súčasnom pôsobení magnetického poľa (50 Hz, 20 µT). Pôvodne neočakávanou zvláštnosťou bola tvorba mostíkových kolónií, ktoré sme dokázali kultivovať opakovane kombinovaným pôsobením UV žiarenia počas 20 sekúnd a magnetického poľa. Mostíkové formácie sa od seba líšili morfológiou a bolo možné rozlíšiť 4 rôzne typy týchto formácií, zastúpenie ktorých sa nelíšilo medzi vzorkami a kontrolou (Obr.3).



Obrázok 3: Rozdielne formy mostíkových útvarov, vyskytujúce sa po pôsobení UV žiarenia, alebo po kombinácií magnetického poľa a UV žiarenia. A: mostík, B-prst, C- dvojprst, D- zhluk.

V prípade, že bola kultúra kvasiniek vystavená len magnetickému poľu, tvorbu mostíkových kolónií sme nezaznamenali. Prítomnosť UV žiarenia bola kľúčová pri indukcii tvorby mostíkových formácií a magnetické pole pôsobilo len ako dodatočný prvok, ktorý mohol zvýšiť ich relatívnu početnosť. Pri opakovanom preočkovaní buniek odobratých z už vzniknutých mostíkov, sme neboli schopní kultivovať ďalšie podobné kolónie, čo naznačuje, že sa nejedná o trvalú genetickú zmenu.

Formovanie kvasinkových kolónií vo forme stoniek alebo mostíkov bolo veľmi málo skúmané a bolo

popísané iba v 3 predchádzajúcich štúdiách. Okrem *S. cerevisiae* sa výskyt tohto špecifického fenotypu zistil aj u *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* a *E. coli*. Iní autori, ktorí predtým študovali tieto mostíkvé formácie, popísali mikroskopický prierez stopky ako viacvrstvovú štruktúru pozostávajúcu z vnútorného jadra obsahujúceho životaschopné bunky a vrstvy vonkajších mŕtvych buniek, ktoré obklopujú toto jadro a tvoria ochranný kryt. Bunky v strede kolónie nie sú v kontakte so živinami a ich bunkový cyklus sa zastavuje v G1 fáze, naopak, bunky, ktoré sú v kontakte so stenami, sa delia, ale sú obmedzené stenami. Počas neustáleho delenia buniek tlačia bunky zo stredu kolónie na povrch média, čo vytvára most [17]. Podľa Scherz et al. [18] môže tvorba podobných špecifických fenotypov byť mechanizmom, pomocou ktorého sa kvasinky v nevhodných podmienkach snažia kolonizovať nové pozície, kde môžu tvoriť novú kolóniu.

Na rozdiel od spomínaných publikácií autorov, ktorí pozorovali morfologické zmeny medzi bunkami v základe kolónie a v mostíkovej časti, v našom prípade bunky v základní a mostíku kolónií neboli morfologicky odlišné. Pri vysvetlení pozorovaných kolónií sa prikláňame k teórii mechanického podráždenia [19], kde sú bunky prítomné v bublinách na agarovom médiu v Petriho miskách chránené pred priamym UV žiarením a rastú z bubliny vo forme stonky alebo mosta. Významné stimulácie tvorby mostíkových kolónií elektromagnetickým poľom (M50/150) možno vysvetliť oneskoreným začiatkom stacionárnej fázy po expozícii magnetickému poľu. Tieto bunky boli v exponenciálnej fáze rastu dlhšie, a preto mali lepšiu schopnosť delenia a tvorby kolónií. Tento predpoklad je tiež podporovaný priemerným počtom kolónií na platni po UV žiarení, keď bol počet všetkých kolónií po expozícii magnetickému poľu o 26 % väčší ako v ostatných vzorkách a kontrole.

Záver

Na základe výsledkov sme dospeli k záveru, že testované magnetické pole bolo príliš slabé na to, aby spôsobilo viditeľnú rastovú zmenu, či dočasne zvýšilo toleranciu voči UV žiareniu procesov adaptívnej stresovej reakcie. Pozorovaný oneskorený nástup stacionárnej fázy rastu o 17 hodín spôsobený reálnym urbánnym poľom (50:150Hz, 1:4), ale nie tým teoretickým (50Hz), môže hovoriť o dôležitosti testovania reálnych nameraných urbánnych elektromagnetických polí, a že skúmanie len teoretických polí môže podhodnotiť reálny vplyv elektromagnetizmu na vybrané mikroorganizmy.

Spomínané urbánne pole (50:150Hz, 1:4) bolo napriek nízkej sila poľa (0,1 mT) kvasinkami zaregistrované, čo vyústilo k zmene početnosti mostíkových útvarov v kombinácii s UV žiarením. UV žiarenie, ako aj magnetické žiarenie, pôsobia ako dočasné environmentálne faktory, ktoré stimulovali tvorbu mostíkových útvarov a nejednalo sa o trvalé zmeny na genetickej úrovni. Presný mechanizmus tvorby týchto formácií zostáva neznámy a mal by byť predmetom ďalšieho štúdia v tejto oblasti.

Poďakovanie

Práca bola financovaná s podporou Slovenskej grantovej agentúry (projekt č. VEGA 1/0018/22) a Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave (projekt č. FPPV-03-2024).

Použitá literatúra

[1] LIN, W., ZHANG, W., PATERSON, G.A., et al. 2020. Expanding magnetic organelle biogenesis in the domain Bacteria. In Microbiome, roč. 8, č.1, s.1-13. ISSN: 2049-2618

[2] SALIEV, T., BEGIMBETOVA, D., MASOUD, A.R., et al. 2019. Biological effects of non-ionizing electromagnetic fields: Two sides of a coin. In Progress in biophysics and molecular biology, roč. 141, č.1, s.25-36. ISSN: 1873-1732

[3] BINHI, V.N. a PRATO, F.S., 2017. Biological effects of the hypomagnetic field: An analytical review of experiments and theories. In PLoS One, roč. 12, č.6, s.e0179340. ISSN: 1544-9173

[4] Markkanen, A., Juutilainen, J., Lang, S., Pelkonen, J., Rytömaa, T. and Naarala, J. 2001. Effects of 50 Hz magnetic field on cell cycle kinetics and the colony forming ability of budding yeast exposed to ultraviolet radiation. In Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association, roč, 22, č.5, s. 345-350. ISSN: 1521186X

[5] USSELMAN, R.J., HILL, I., SINGEL, D.J., et al. 2014. Spin biochemistry modulates reactive oxygen species (ROS) production by radio frequency magnetic fields. In PLoS ONE, roč. 9, č. 3, s. e93065. ISSN: 1544-9173

[6] TANG, R., XU, Y., MA, F., et al. 2016. Extremely low frequency magnetic fields regulate differentiation of regulatory T cells: Potential role for ROS-mediated inhibition on AKT. In Bioelectromagnetics, roč. 37, č.1, s 89–98. ISSN: 1544-9173

[7] NIELSEN, J., 2019. Yeast systems biology: model organism and cell factory. In Biotechnology journal, roč 14, č 9, s.1800421. roč. č ISSN: 2456-7051

[8] RUIZ-GÓMEZ, M.J., SENDRA-PORTERO, F. a MARTÍNEZ-MORILLO, M., 2010. Effect of 2.45 mT sinusoidal 50 Hz magnetic field on Saccharomyces cerevisiae strains deficient in DNA strand breaks repair. In International journal of radiation biology, roč. 86, č.6, s.602-611. ISSN: 1362-3095

[9] KTHIRI A., HIDOURI S., WIEM T., et al. 2019. Biochemical and biomolecular effects induced by a static magnetic field in Saccharomyces cerevisiae: Evidence for oxidative stress. In PLOS One. roč. 14, č.1, s. 1-12. ISSN: 1544-9173

[10] DA MOTTA, M.A., MUNIZ, J.B.F., SCHULER, A., et al., 2004. Static magnetic fields enhancement of Saccharomyces cerevisae ethanolic fermentation. In Biotechnology progress, roč. 20, č. 1, s.393-396. ISSN: 15206033

[11] LUO, J., HE, W., XING, X., et al. 2019. The phytoremediation efficiency of Eucalyptus globulus treated by static magnetic fields before sowing. In Chemosphere, roč. 6 č.226, s.891-897. ISSN: 0045-6535

[12] KATARIA, S., JAIN, M., RASTOGI, A. a BRESTIC, M., 2021. Static magnetic field treatment enhanced photosynthetic performance in soybean under supplemental ultraviolet-B radiation. In Photosynthesis Research, roč. 150, č.1, s.1-16. ISSN: 1573-5079

[13] LANTOW, M., LUPKE, M., FRAHM, J., et al. 2006. ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1,800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes. In Radiation and Environmental Biophysics, roč 45, č. 55, s62. ISSN: 1432-2099

[14] HU, R., WANG, M.Q., NI, S.H., a kol., 2020. Salidroside ameliorates endothelial inflammation and oxidative stress by regulating the AMPK/NF-κB/NLRP3 signaling pathway in AGEs-induced HUVECs. In European journal of pharmacology, č. 867, s.172797. ISSN: 1879-0712

[15] Novák J., Strašák L., Fojt, L., Slaninová, I., Vetterl V. 2007. Effects of low-frequency magnetic fields on the viability of yeast, In Bioelectrochemistry, roč. 70, č. 1, s.115-121. roč. č. s. ISSN: 1878562X

[16] Coleman, C.B., Gonzalez-Villalobos, R.A., Allen, P.L., Johanson, K., Guevorkian, K., Valles, J.M. and Hammond, T.G., 2007. Diamagnetic levitation changes growth, cell cycle, and gene expression of Saccharomyces cerevisiae. In Biotechnology and bioengineering, roč. 98, č. 4, s.854-863. ISSN: 1097-0290

[17] Daniels K.J., Pujol C., Srikantha T., Soll D.R. 2012. The "finger," a unique multicellular morphology of Candida albicans induced by CO2 and dependent upon the Ras1-cyclic AMP pathway. In Eukaryotic Cell. 2012, roč. 11, č.1, s. 1257-1267. ISSN: 1535-9778

[18] Scherz R., Shinder V., Engelberg D. 2001. Anatomical Analysis of Saccharomyces cerevisiae Stalk-Like Structures Reveals Spatial Organization and Cell Specialization. In Journal of Bacteriology. 2001, roč. 183, č.1, s. 5402-5413. ISSN: 1098-5530

[19] Engelberg D., Mimran A., Martinetto H., Otto J., Simchen G., Karin M., Fink G.R. 1998. Multicellular Stalk-Like Structures in Saccharomyces cerevisiae. In Journal of Bacteriology. 1998, roč. 180, č.1, s. 3992-3996. ISSN: 1098-5530

Variable cadmium content in cellular compartments of wheat tissues

Laura Žideková[1], Martina Gregorová[1]
Supervisor: Ildikó Matušíková[1]
[1]Institute of Chemistry and Environmental Science, FNS UCM, Námestie J. Herdu 2, Trnava, 917 01, Slovak Republic
zidekova2@ucm.sk, ildiko.matusikova@ucm.sk

Abstract
Cadmium, a prevalent contaminant stemming from industrial activities and mining, poses significant health risks to humans and the environment. Its toxic effects are well-documented, primarily manifesting in the liver and kidneys upon accumulation in the body. Chronic exposure to cadmium leads to severe health complications such as kidney damage, hypertension, and cancer. Moreover, its propensity for long-term accumulation in bones contributes to osteoporosis and bone weakening. The entry of cadmium into the food chain through plants further exacerbates its impact. Understanding the mechanisms of cadmium uptake and developing methods for analyses of transport and accumulation in plant tissues is crucial for developing effective strategies to mitigate its environmental and health implications. This paper provides an overview of cadmium's toxic effects on plants and discusses some methods for its quantification in tissues as well as cell compartments.

Key Words: cadmium, wheat, gamma spectrometry, quantification, cellular compartments

Introduction
Cadmium is a heavy metal that often occurs as a contaminant in the environment due to human activities, especially industrial production and mining. Its presence is associated with various industrial processes such as mining, smelting, and refining of zinc ores, as well as natural processes such as erosion and weathering of rocks. Although cadmium is not the primary target of mining, its presence in the air, water, and soil poses a serious risk to human health and the environment. The toxic effects of cadmium on the organism are well-documented. Upon entering the body, cadmium accumulates in the liver and kidneys, where it can cause serious damage. Its accumulation in these organs can lead to chronic diseases such as kidney damage, hypertension, and cancer. Additionally, cadmium tends to accumulate in bones over the long term, which can lead to osteoporosis and bone weakening. It is important to pay attention to and limit exposure to cadmium because its toxic effects can have serious consequences for human health and the environment. Effective regulations and measures to protect against cadmium exposure are necessary to mitigate its negative impacts. Plants serve as the entry point into the food chain for cadmium [1].

Cadmium has the ability to enter plants through uptake from soil and water. Cadmium reaches the roots of plants through various transport mechanisms. The main pathways of uptake are passive diffusion and active transport across root cell membranes. This process is influenced by various factors such as cadmium concentration in the soil, soil pH, and nutrient availability [2]. Subsequently, cadmium is transported through various tissues of the plant. The main transport pathways are xylem and phloem, which allow the movement of cadmium from roots to aboveground parts of the plant. This transport can be influenced by various factors such as soil structure, growth conditions, and physiological state of the plant. Cadmium accumulates in various tissues of plants, including roots, stems, leaves, and fruits. Its accumulation is influenced by various factors including cadmium concentration in the soil, soil type, physiological state of the plants, and genetic properties. In some plant species, higher accumulation of cadmium can occur in certain tissues, which may result in increased risk to human health and the environment. It is important to understand the mechanisms of uptake, transport, and accumulation of cadmium in tissues to develop effective strategies to minimize its impact on the environment and human health [3]. Furthermore, methods need to be developed for routine quantification and analysis of metals in plant cells and tissues. Allocation in individual cell compartments might help to provide further

knowledge for understanding metal toxicity/tolerance.

1 Cadmium in wheat

Wheat is one of the most important staple crops and is cultivated in many regions of the world with a production of approximately 743 million tons annually. The concentration of cadmium can be relatively high in agricultural settings, and due to transport mechanisms, Cd accumulates in various tissues. Its allocation and accumulation can vary even within individual cellular compartments. The compartment and form or amount in which the toxic metal is allocated may impact plant tolerance. However, metal allocation at the cellular level is not commonly studied.

Many studies show differences in the concentration and site of cadmium accumulation in wheat tissues. Shi et al. examined 12 varieties of winter wheat regarding the uptake and accumulation of cadmium in different plant parts when grown in soils with a cadmium content of 13.7 $mg.kg^{-1}$. Concentrations measured in wheat grains ranged from 0.13 $mg.kg^{-1}$ in the JM85 variety to 0.18 $mg.kg^{-1}$ in the MM45 variety. The average cadmium content in the twelve wheat varieties was 0.18 $mg.kg^{-1}$. The maximum concentration of cadmium in wheat-based foods intended for children is set at 30 $\mu g.kg^{-1}$ due to the demonstrated toxicity of cadmium to organisms. It is important to identify wheat varieties with low accumulation of this metal. It is crucial to recognize varietal traits determining cadmium absorption and translocation.

2 Methods for determining the total Cd content in wheat tissues

The determination of the total cadmium (Cd) content in wheat tissues is crucial for assessing the health and environmental risks associated with the consumption of grain and wheat products. Considering cadmium's toxicity to human health and its tendency to accumulate in plants, it is important to have reliable analytical methods for accurately determining its concentration in wheat.

Atomic absorption spectrometry (AAS) focuses on measuring the absorption of electromagnetic energy of cadmium as light passes through the sample. Cadmium is reduced to atoms in vapor form, which absorb specific wavelengths of light. AAS is one of the most common methods used for quantitatively determining cadmium in plant tissues.

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) combines the high temperature of induced plasma with mass spectrometry to accurately determine the concentration of metal elements, including cadmium, in plant tissues. ICP-MS offers high sensitivity and precision.

Similar to ICP-MS, inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) utilizes the high temperature of induced plasma to decompose the sample and subsequent light emissions, which are then measured to determine the concentration of cadmium and other elements in plant tissues.

Flame atomic absorption spectrometry (FAAS): This method is used to determine lower concentrations of cadmium in tissues. It offers a simpler approach and lower sensitivity than ICP-MS or ICP-OES.

X-ray fluorescence spectrometry (XRF) utilizes X-ray emissions when exciting the atoms of metal elements, including cadmium, to determine their presence and concentration in plant tissues.

Gamma spectrometry utilizes the detection of gamma radiation emitted by radioactive isotopes of metal elements, including cadmium. This method allows for the quantitative determination of cadmium concentration in plant samples based on characteristic gamma spectra. The principle of gamma spectrometry involves the emission of gamma photons from radioactive isotopes of cadmium present in plant tissues. Gamma radiation detectors are used to record and analyze these gamma photons, enabling the determination of cadmium concentration in the sample [4].

Quantification of cadmium in cellular compartments is crucial for understanding its toxic effects at the cellular level and identifying mechanisms of its action in the body. Cellular compartments such as the nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum, and lysosomes have specific functions and can be structurally and functionally damaged by cadmium accumulation. Studying the accumulation of cadmium in various cellular compartments can help in developing effective strategies to protect cells from its negative effects and enhance our understanding of its toxicity in the body.

3 The significance of quantifying cadmium in cellular compartments

Quantifying cadmium in cellular compartments is crucial for understanding its toxic effects at the cellular level and identifying the mechanisms of its action in the body. Cellular compartments such as the nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum, and lysosomes have specific functions and can be structurally and functionally damaged by cadmium accumulation.

Quantifying cadmium in these compartments allows for a more precise determination of its distribution within the cell and estimation of its impact on cell and tissue functionality.

For example, accumulation of Cd in mitochondria may lead to dysfunction of the respiratory chain and generation of reactive oxygen species. In the endoplasmic reticulum, the effects of Cd may interfere with protein synthesis and lipid metabolism, potentially leading to cell death. Cadmium can also accumulate in the cell nucleus and affect the cell cycle, DNA replication, and gene transcription. Allocation of Cd has been confirmed in cell nuclei, for example, in soybeans [5]. Direct genotoxicity of Cd has been confirmed as an increase in the number of polymorphic loci during growth in the presence of Cd [6]. Studying the accumulation of cadmium in various cellular compartments can help in developing effective strategies to protect cells from its negative effects and improve our understanding of its toxicity in the body.

4 Results and discussion

Detection of Cd content in cellular fractions by AAS method is an important tool in biochemical and toxicological research for understanding the distribution and accumulation of cadmium in cells. It provides detailed information on Cd concentration in various parts of the cell, which is crucial for assessing its toxic effects and mechanisms of action in the body. However, due to the amount of material required for analysis, radioanalytical techniques appear to be a suitable choice, offering higher sensitivity and enabling analysis from small amounts of plant tissue. Therefore, we modified and adapted the AAS method described by Uddin et al. to radioanalytical procedures.

For the application of the radioanalytical method to the growth medium, we add an exact content of radioactively labeled isotope ^{132}Cd, which the plant absorbs from the growth medium along with other nutrients, including non-radioactive Cd. After a certain cultivation time, Cd is translocated within the plant depending on the presence of typical plant membrane barriers. The process of detecting Cd content in cellular fractions by gamma spectrometry begins with sample preparation for fractionation centrifugation. The tissue is ground in the presence of liquid nitrogen and homogenized by a laboratory mill to a strip state, which can be easily homogenized in a pre-chilled extraction solution. After homogenization in liquid nitrogen and in the extraction solution, we obtained fractions of cell walls (FI), organelles (FII), and cytosol and vacuole (FIII) by sequential centrifugation. The obtained fractions were analyzed using a gamma spectrometer.

Analysis of root fractions showed that the distribution of Cd in the cellular compartments of different wheat varieties is not uniform. The highest concentrations of Cd were found in the cytosol in all varieties, while the lowest content was observed in the organelle fraction (Chart 1). Many studies have focused on identifying the main sites of Cd accumulation. Gao et al. [7] studied the cellular and subcellular localization of Cd ions in wheat using immunohistochemical chelation of free Cd in tissues followed by labeling with Cd^{2+}-EDTA complex colloidal gold. The authors observed clear gold particles in the middle lamella and epidermal cell walls, as well as in the cortex and endodermal cells of the roots. Vásquez et al. [9] demonstrated that the main sites of Cd accumulation in the roots of pennycress (*Thlaspi caerulescens*) are cell walls and middle lamella, indicating Cd binding to ion exchange sites. The presence of Cd in cell walls and middle lamella was also confirmed by Khan et al. [10] in maize plants (*Zea mays*). Other sites of Cd ion localization include vacuoles and membranous organelles. Increased accumulation of Cd in vacuoles and cellular organelles likely inhibits Cd transport to the xylem and above-ground parts of plants [7]. In the tested varieties, we studied the content of absorbed ^{109}Cd in various cellular fractions. The analyses (Chart. 1) revealed that the distribution of Cd in the cellular compartments of individual wheat varieties is not uniform. The high levels of Cd were determined in the cell walls (FI) of all varieties, while the lowest content was found in the organelle fraction (FII). Our results suggest that in cellular organelles, the varieties Durgalova and Slovenka accumulate the least Cd, whereas Sunanka accumulates the most (Chart 1).

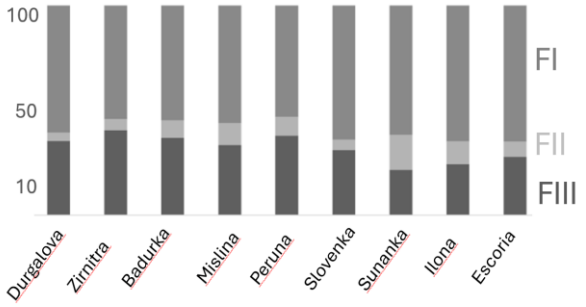


Chart 1: The ratio of absorbed ^{109}Cd in roots of plants. Fractions of cell walls (F I.), organelles (F II.), and cytosol and vacuole (F III.) from above-ground parts of wheat from five plants.

The allocation of Cd at the cellular level can vary among different varieties and even within individual tissues. Sunanka variety allocated more metal to root organelles than Zirnitra. On the other hand, Zirnitra variety stored a relatively small amount of Cd in the root organelles compared to the shoots; the opposite was true for variety Sunanka (Chart 2).

Analyses using gamma spectrometry indicated variable distribution of metals in different cellular compartments. This likely plays a role in the cells' ability to protect sensitive structures from metal toxicity, as the results suggest, for example, a correlation between higher tolerance and Cd allocation predominantly in cell walls.

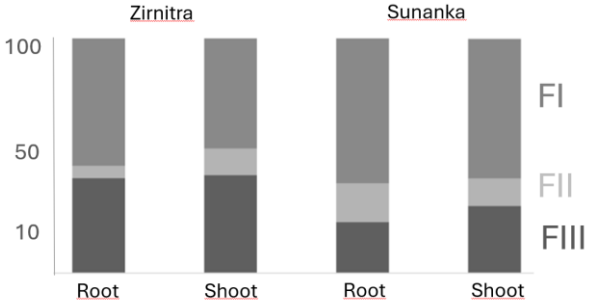


Chart 2: The ratio of fractions obtained from roots and above-ground parts for the Sunanka and Zirnitra varieties (n=5). Fractions of cell walls (F I.), organelles (F II.), and cytosol and vacuole (F III.).

Analyses using gamma spectrometry suggested that the allocation of metals in individual cell compartments plays a role in the ability of cells to protect sensitive structures from metal toxicity. The accumulation of cadmium in the cell walls of tissues likely contributes to the protection of the photosynthetic apparatus, which can effectively generate resources even in the presence of the toxic element; these are necessary for implementing a costly induced defense against prolonged exposure to heavy metals.

The advantages of the gamma spectrometry method in detecting Cd content in cellular fractions include its high sensitivity, accuracy, and reliability. This method is capable of detecting even very low concentrations of Cd in cells and provides reliable results with high precision. Despite its advantages, gamma spectrometry method also has some limitations. These limitations include the need for specialized equipment and facilities, which can be costly and inaccessible for some laboratories. Another limitation is the time-consuming nature of the analysis and possible interferences with other elements, requiring thorough verification and control of influences. Radioanalytical methods generate radioactive waste, which requires specific handling and procedures. Its use contributes to a better understanding of the effects of cadmium at the cellular level, requiring relatively small amounts of plant material.

Conclusion

Radioanalytical approaches are significant tools for quantifying cadmium (Cd) in cells, not only in the field of toxicology research but also in biochemical and biological studies. Their greatest advantage lies in their extreme sensitivity and ability to detect even very low concentrations of cadmium in cells, enabling the analysis of small amounts of plant material. This property allows for more precise quantification of cadmium content in cells, leading to a better understanding of its distribution and accumulation in various cellular compartments. Their use in biochemical and toxicological research contributes to a better understanding of the distribution, accumulation, and toxic effects of cadmium in the cellular environment, which is crucial for health protection and environmental monitoring.

Acknowledgement

The paper was supported by the Slovak Research and Development Agency under grant No. APVV-21-0504.

Used literature

[1] SUNITHA, et al. 2013. Cellular and molecular mechanisms of heavy metal tolerance in plants: A brief overview of transgenic plants overexprssing phytochelatin synthase and metallothionein genes, In Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology, vol. 14, no. 1-2, pp. 33-48. ISSN 0972-2025.

[2] CLEMENS, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. In Biochimie, vol. 88, no 11, pp. 1707-1719. ISSN 1638-6183.

[3] JAISHANKAR, M. et al. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. InInterdisciplinary Toxicology, vol. 7, no. 2, pp. 60-72. ISSN 1337-9569.

[4] UDDIN, M. 2020. Cadmium accumulation, subcellular distribution and chemical fractionation in hydroponically grown *Sesuvium portulacastrum* [Aizoaceae]. Available on: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0244085

[5] KONOTOP, Y. et al. 2012. Defense responses of soybean roots during exposure to cadmium, excess of nitrogen supply and combinations of these stressors. In Molecular Biology Reports, vol. 39, pp. 10077-10087.
[6] GHIANI, A. et al. 2014. The Combined Toxic and Genotoxic Effects of Cd and As to Plant Bioindicator *Trifolium repens L.* In Plos one. Available on: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0099239
[7] GAO, W. et al. 2015. Cellular and subcellular immuohistochemical localization and quantification of cadmium ions in wheat *(Triticum aestivum).* In Public Library of Science One, vol. 10, no. 5. ISSN 1932-6203.
[8] VÁSQUEZ, M.D. 1992. Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens (Brassicaceae),* a metallophyte that can accumulate both metals. In Journal of Plant Physiology, vol 140, pp. 350-355. ISSN 0176-1617.
[9] KHAN, D.H. 1984. An X-ray microanalytical study of the distribution of cadmium in roots of *Zea mays L.* In Journal of Plant Physiology, vol. 115, pp. 19-28. ISSN 0176-617.

FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED UNIVERZITY MATEJA BELA

UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED A INFORMATIKY

Sekcia

PhD. II.

Povodňové riziká v priemyselných areáloch situovaných v blízkosti riek v Nitrianskom samosprávnom kraji

Flood risk in industrial areas located near rivers in the Nitra self-governing region

Adam Čaplák[1]
Školiteľ: Henrich Grežo
[1]Katedra ekológie a environmentalistiky, FPVaI UKF, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,
adam.caplak@ukf.sk, hgrezo@ukf.sk

Abstrakt

Prírodné nebezpečenstvá predstavujú významné hrozby po celom svete. Medzi rôznymi prírodnými nebezpečenstvami sa povodňové vnímajú ako hlavná príčina úmrtia a zdevastovania so značnými ekonomickými a sociálnymi dôsledkami. Povodne na Slovensku si od januára do konca júna 2023 vyžiadali 112-krát vyhlásenie III. stupňa povodňovej aktivity (SPA) a 189-krát II. SPA. Výskum sa zameriava na možné riziká v priemyselných areáloch v blízkosti povodí v Nitrianskom samosprávnom kraji (NSK). NSK patrí medzi najrýchlejšie rastúce regionálne ekonomiky Slovenska. Spočiatku sme sa venovali vymedzeniu NSK z hľadiska rozmiestnenia priemyselných areálov, záplavových čiar a vodných tokov v minulosti, mapovanie bolo doplnené terénnym výskumom. Poukázali sme na nevhodné situovanie priemyselných parkov v blízkosti vodných tokov a v záplavových zónach. Taktiež, sme poukázali na aktuálne plánovanie výstavby v takýchto rizikových zónach.

Kľúčové slová: povodeň, priemyselný areál, záplavová čiara, Nitriansky samosprávny kraj

Abstract

Natural hazards represent significant threats worldwide. Among various natural hazards, floods are perceived as the leading cause of death and devastation, with considerable economic and social consequences. Floods in Slovakia from January to the end of June 2023 prompted the declaration of Level III flood alert 112 times and Level II flood alert 189 times. Research focuses on potential risks in industrial areas near watersheds in the Nitra Self-Governing Region (NSGR). NSGR is among the fastest-growing regional economies in Slovakia. Initially, we focused on delineating NSGR in terms of the distribution of industrial areas, floodplains, and watercourses in the past, with mapping supplemented by field research. We pointed out the inappropriate siting of industrial parks near watercourses and in flood zones. Additionally, we highlighted current construction planning in these areas.

Key Words: flood, industrial area, flood line, Nitra self-governing region

Úvod

Povodne sú prirodzenými katastrofami, ktoré môžu mať ničivý vplyv na životné prostredie, infraštruktúru a ľudský život a vytvárajú nebezpečné podmienky, ktorým sú ľudia obzvlášť vystavení [1], [2]. Manažment povodňových rizík sa čoraz viac zakladá na riziku a preto je odhad povodňových škôd založený čoraz viac na štúdiách hodnotených povodňových rizík [3]. Dôležitú úlohu zohráva mapovanie povodňových rizík, územné plánovanie, systémy včasného varovania, návrh reakcie a implementácie opatrení na zníženie povodňového rizika [4], [5]. Metódy zmiernenia povodní sa implementujú s cieľom znížiť škody spôsobené povodňami, buď zabránením ich vzniku alebo minimalizovaním ich vplyvu [1]. Celková vyčíslená škoda spôsobená povodňami medzi rokmi 2003 až 2022 bola na 216 825 144 eur [24]. V Slovenskej republike (SR) zabezpečuje vyhotovovanie máp povodňového ohrozenia a máp povodňového rizika správca vodohospodársky významných vodných tokov, ktorým je Slovenský vodohospodársky podnik, š. p., Banská Štiavnica [6]. SR patrí medzi stredne vyspelé priemyselné krajiny, kde súčasné hospodárstvo SR je výsledkom dlhého vývoja [6], [9]. Podľa ekonomických činností najväčší podiel na regionálnej hrubej pridanej hodnote v roku 2021 tvoril priemysel 35,2% v NSK [17]. Pričom škody spôsobené povodňami v NSK boli vyčíslené za obdobie 2003 až 2022 na celkovú hodnotu 9 545 791 eur [24]. Frekvencia a rozsah škôd z náhlových búrok sa postupne zvyšuje, pričom mestské oblasti sú relatívne zraniteľnejšie v dôsledku vysokého počtu obyvateľov a koncentrácie majetku. Rýchla urbanizácia v mestách patrí medzi kľúčové faktory prispievajúce k zvýšenému riziku škôd spôsobených

povodňami [7], [8]. Priaznivý vývoj ekonomiky Slovenska, ako aj priestorové a infraštruktúrne možnosti NSK boli impulzom pre budovanie a rozvoj priemyselných parkov, ktoré dnes existujú v rôznych častiach regiónu a úspešne v nich pôsobia mnohé zahraničné i medzinárodné spoločnosti [10].

Naším cieľom výskumu bolo zmapovanie súčasného výskytu priemyselných areálov v NSK s možným rizikom povodní. Riziko, ktoré môže nastať pri nadmerných dažďoch a následnom zaplavení územia areálov.

1 Metodika

Metodika pozostáva z nasledujúcich krokov: viac-časová analýza vodných tokov z historických máp; tvorby povodňových máp; a superpozícia historických a súčasných geodát o vodných tokoch a extrahovaných záplavových čiar z povodňových máp [11].

Na hodnotenie možného rizika povodní v priemyselných areáloch v blízkosti vodných tokov sme využili metodiku Greža a kol. 2020 [11], ktorá bola nami doplnená a modifikovaná na naše záujmové územie. Využili sme viac-časovú analýzu vodných tokov z historických máp I. vojenského mapovania (1769 a 1782-1784), II. vojenského mapovania (1819-1858), III. vojenského mapovania (1857-1883) a máp povodňového rizika [25]. Mapy sme jednotlivo pomocou georeferencovania preniesli z online podoby do QGis pomocou vopred vytýčených bodov (kostolov ktorých vznik sa datuje pred rok 1769).

Záplavové čiary vyhotovené Slovenským vodohospodárskym podnikom, š. p., Banská Štiavnica sme pomocou georeferencovania preniesli z PDF dokumentov do QGis pomocou súčasných vodných tokov [12].

Pomocou rastrového digitálneho modelu reliéfu (DMR) sme sledovali zmeny nadmorských výšok v mestách a vodných tokoch. Na rastrové vrstvy sme naniesli vektorové vrstvy záplavových čiar s priemernou dobou opakovania povodní (Q5, Q10, Q50, Q100 a Q1000), vrstvu priemyselných areálov v mestách NSK, čo nám pomohlo vytýčiť lokality s možným rizikom povodní. Vrstvu priemyselných parkov sme vytvorili pomocou QGis pluginu QuickOSM. OSM tvorí komunita používateľov, kladie dôraz na miestnu znalosť. Prispievatelia využívajú letecké snímky, GPS prístroje [13]. Aby sme vyplnili túto medzeru [14], vykonali sme kontrolu GPS súradníc priemyselných parkov, ktoré sú voľne dostupné a vydávané Ministerstvom hospodárstva SR [15]. Údaje sme doplnili aj fotodokumentáciou, ktorú sme vykonali počas terénneho výskumu. V prepojení OSM s GPS súradnicami a satelitnými snímkami z Geodetického kartografického ústavu Bratislava [32], sme získali pôdorys priemyselných budov a veľkosti priemyselných areálov v záplavových čiarach. Nakoniec sme tieto kontrolované klasifikácie zlúčili [14] s údajmi zo skôr získanej vrstvy prostredníctvom OSM (priemyselné areály) a vypočítali pomocou QGis jednotlivé rozlohy areálov v záplavových zónach.

1.1 Záujmové územie

NSK v súčasnej podobe vznikol v roku 1996 zákonom NR SR č. 221/1996 Z. z. o územnom a správnom usporiadaní SR [16].

NSK rozlohou 6 343,7 km^2 zaberá 12,9 % územia SR. Nachádza sa v juhozápadnej časti SR, pričom na juhu hraničí s Maďarskou republikou, na východe s Banskobystrickým krajom, na severe s Trenčianskym krajom a na západe s Trnavským krajom. Územím kraja preteká viacero riek Váh, Dunaj, Nitra, Hron, Ipeľ a Žitava. V NSK sa nachádza 354 obcí, z ktorých má 16 štatút mesta [17].

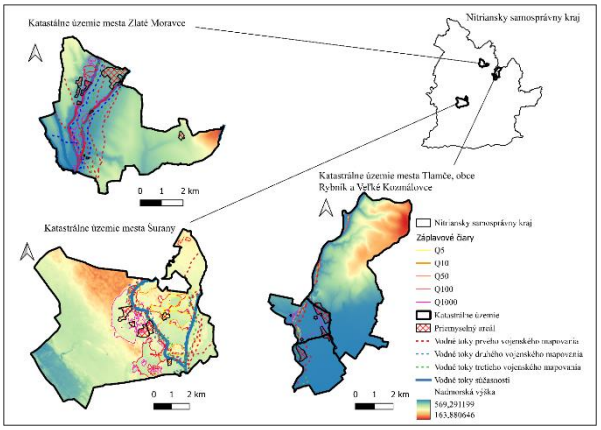
Kraj má významnú geopolitickú polohu – leží na európskej juhovýchodnej rozvojovej osi, definovaná v rámci programu priestorového rozvoja Európy ako tzv. Red Octopus (Červená chobotnica). Toto rozvojové rameno vedie po trase Stuttgart – Ulm – Mníchov – Salzburg/Linz – Viedeň – Bratislava – Budapešť – Belehrad [16].

Ekonomika NSK patrí medzi najrýchlejšie rastúce regionálne ekonomiky SR [18]. V kraji sú najviac rozvinuté tri odvetvia – papierenský, chemický a strojársky priemysel. Rozloženie priemyslu v kraji má špecifický charakter, pretože sa sústreďuje v mestách, ktoré tak získavajú homogénny charakter [19]. Medzi silné stránky kraja patria: kvalifikovaná pracovná sila, univerzita a výskumné centrum nachádzajúce sa v kraji, vybudovaná diaľnica spájajúca Nitru s Trnavou, potenciál využitia vodných zdrojov/tokov. Medzi hlavných zahraničných investorov v regióne patrí Jaguar Land Rover, Foxconn, ZKW Slovensko, Heineken, Osram a Secop [20].

2 Výsledky a diskusia

Z celkového počtu 16 miest v NSK, sme zistili výskyt záplavových čiar v troch mestách (Zlaté Moravce, Šurany a Tlmače), ktoré zasahujú do priemyselných areálov. V meste Tlmače sa vyskytujú priemyselné areály, ktoré zasahujú do dvoch katastrálnych území obcí, obce Rybník a Veľké Kozmálovce. Z celkovej rozlohy priemyselných areálov 1383 ha v NSK sa v záplavových čiarach nachádza 91 ha. V Mape 1

sledujeme priemyselné areály, ktoré zasahujú do záplavových čiar v katastrálnych územiach mesta Zlaté Moravce, Šurany, Tlmače, obcí Rybník a Veľké Kozmálovce.



Mapa 1 Priemyselné areály v záplavových čiarach v NSK
Zdroj: [15], [21], [32]

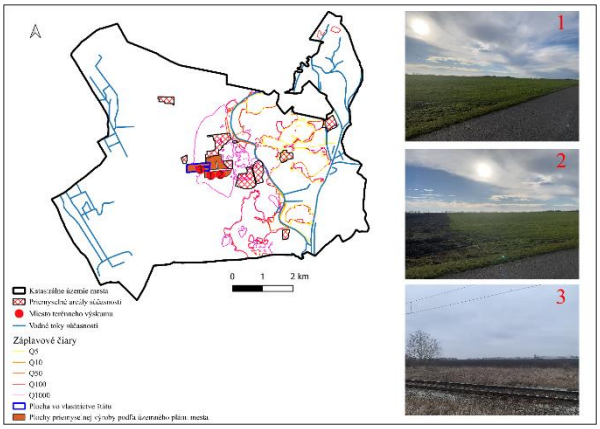
Najväčšiu rozlohu priemyselných objektov sme zistili v oblastiach záplavových čiar v mesta Šurany. V záplavovej čiare Q1000 69 ha, Q100 2 ha, Q10 12 ha a Q5 12 ha (Tabuľka 1). V katastrálnom území mesta Tlmače, obce Rybník a Veľké Kozmálovce sledujeme objekty iba v oblasti Q1000 o rozlohe 12 ha a Zlatých Moravciach v čiare Q1000 10 ha a Q50 2 ha.

Katastrálne územie	Q1000 (ha)	Q100 (ha)	Q50 (ha)	Q10 (ha)	Q5 (ha)
Šurany	69	2	0	12	12
Tlmače, Rybník, Veľké Kozmálovce	12	0	0	0	0
Zlaté Moravce	10	0	2	0	0

Tabuľka 1 Rozloha priemyselných objektov v NSK v záplavových čiarach
Zdroj:[15], [21], [22]

Počas terénneho mapovania sme zaznamenali plánovanú výstavbu v dvoch mestách a to Šurany a Vráble.

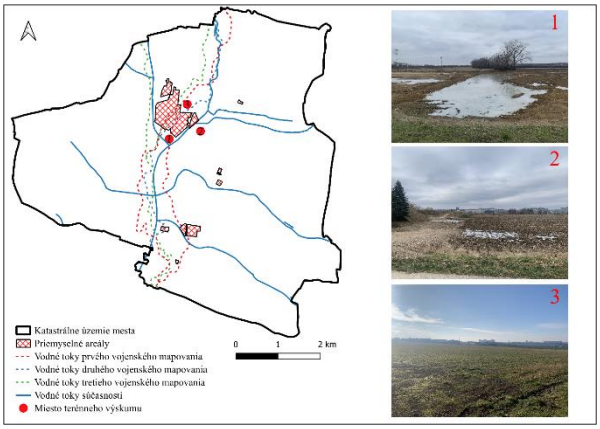
Počas terénneho mapovania toku rieky Nitra (2 SPA) v katastrálnom území mesta Šurany, sme zmapovali aj možné plochy priemyselného areálu. Areál sa nachádza v oblasti záplavovej čiary Q1000. Zistili sme, že v oblasti sa ani po výdatnom snežení, následnom oteplení a topení snehu nevyskytuje žiadne riziko záplav a povodní (Mapa 2).



Mapa 2 Možná plánovaná výstavba priemyselných objektov v katastrálnom území mesta Šurany
Zdroj: [15], [22], [32]

Tok rieky Nitry, ktorý o 10:45h dosiahol úroveň 276 cm a teda 2 SPA [23]. Na stanici Nové Zámky a rieke Nitra bolo v čase 26.12.2023 o 15:30 nameraný vodný stav 560 cm a teda 3 SPA [24].

Na ploche číslo 1 v katastrálnom území mesta Vráble (Mapa 3), môžeme sledovať územie po výdatnom snežení a topení snehu s umiestnením plochy výstavby na území toku rieky počas prvého vojenského mapovania. Územie, ktoré môže byť problémové pre budúcnosť. Plocha číslo 1, je podľa územného plánu mesta Vráble označovaná ako plocha vyššej a nižšej komerčnej občianskej vybavenosti a služieb doplnkovo s technickou vybavenosťou súvisiacou s prevádzkou občianskej vybavenosti.



Mapa 3 Možná plánovaná výstavba priemyselných objektov v katastrálnom území mesta Vráble
Zdroj: [15], [21], [25], [32]

Podľa výskumu Greža a kol. 2020 [11], sa výskum zameral na hodnotenie povodňového rizika v prímestských zónach nachádzajúcich sa v záplavových územiach a doplnený z údajov z národných povodňových máp. Kde v priemyselnom parku v Nitre (jeden z najväčších priemyselných parkov Slovenska, spoločnosti Jaguar Land Rover) sa v mapách povodňového rizika neobjavuje ako problémová lokalita. Napriek tomu existujú protipovodňové opatrenia – zníženie hladiny prúdenia vody, úprava brehu rieky do dĺžky 15 km a zvýšenia stavebných základov. Tieto opatrenia spolu so znižovaním podzemných vôd by malo chrániť oblasti priemyselného parku a okolitých obcí.

Aby mestá udržali krok s trvalo udržateľným rozvojom, musia chrániť oblasti náchylné na záplavy, ktoré si vyžadujú značné investície [26]. V tejto súvislosti sú automatické a presné povodňové mapy odvodené zo satelitu pre rýchlu reakciu na núdzové situácie a hodnotenie škôd [27]. V lokalite Vráble je navrhnutá nová výstavba v zónach, ktoré podľa Greža a kol. 2020 [11] sú extenzívne využívané lúky a pasienky, cez ktoré pretekali v minulosti rozvetvené vodné toky. Taktiež, v meste Šurany sme zaznamenali plánovanú výstavbu v oblasti záplavovej čiary Q1000.

Záver

Povodňové riziko nie je možné úplne eliminovať, ale jeho dopad je možné výrazne znížiť pomocou geografického informačného systému (GIS) a riešení na báze diaľkového prieskumu Zeme [28]. Problém záplav vychádza hlavne z nedostatočného plánovania a ekonomických okolností ľudských sídel na zaplavovaných rovinách, čo spôsobuje spúšťanie katastrof prostredníctvom sociálnych problémov, ktoré ovplyvňujú a menia životné prostredie [29].

Cieľom bolo analyzovať a informovať o rozlohe a umiestnení priemyselných areálov v zónach s možným rizikom povodní. Zistili sme, že z celkového počtu 16 miest v NSK, sa nachádza výskyt záplavových čiar v troch mestách (Zlaté Moravce, Šurany, Tlmače), ktoré zasahujú do priemyselných areálov.

Priemyselné areály sa vyskytujú priamo v záplavových zónach o celkovej rozlohe 91 ha, z čoho 12 ha je v zóne Q5, 12 ha Q10, 2 ha zóne Q50 a 2 ha v zóne Q100 a v zóne Q1000 je zvyšných 63 ha. Taktiež, počas terénneho mapovania sme zistili plánovanú výstavbu v meste Vráble, na území, cez ktoré v minulosti pretekal vodný tok. Na mieste, kde počas intenzívneho odmäku zostala viditeľná hodnota snehu. Počas výskumu sme sa zamerali aj na ohlásenú výstavbu „gigabaterkárne“ v meste Šurany, ktorej výstavba môže byť plánovaná v záplavovej zóne Q1000. Na danom mieste sa nevyskytli žiadne viditeľné hodnoty snehu počas odmäku.

Preto je dôležité určiť príčiny povodní, ako aj oblasti, ktoré sú náchylné na povodne, ktoré ovplyvňujú životné prostredie a hospodárstvo regiónov [30], [31].

Poďakovanie

Ďakujem môjmu školiteľovi doc. Mgr. Henrichovi Grežovi, Phd. za odborné vedenie, ústretovosť a cenné rady, ktorými ma usmerňoval pri výskume danej problematiky.

Použitá literatúra

[1] ROSMADI, Hazig et al. 2023. Reviewing Challenger of Flood Risk Management in Malaysia. In Water 2023, vol. 15, no. 2, pp. 1-21. ISSN 2073-441.

[2] Flood Hazard: Department of Planning and Environment. [online]. Flood Hazard: 2022 [cit. 24.1.2024]. Dostupné z: https://www.environment.nsw.gov.au/-/media/OEH/Corporate-Site/Documents/Water/Floodplains/flood-risk-management-flood-hazard-220059.pdf

[3] MERZ, Bruno et al. 2010. Assessment of economic flood damage. In Natural Hazards and Earth System, vol. 10, no. 8, pp. 1699-1724. ISSN 1684-9981.

[4] GUO, Jiahoong et al. 2021. What factors have drivenn urbanization in China? In Ennvironment Development and Sustainability, vol. 26, no. 3, pp. 6508-6526. ISSN 1387-585X.

[5] ZHANG, Jiayang, CHEN, Yangbo. 2019. Risk Assesment of Flood Disaster Induced by Typhhoon Rainstorms in Guangdong Province, Chine. In Sustainability, vol. 11, no. 10, pp. 3-23. ISSN 2071-1050.

[6] Národná stratégia trvalo udržateľného rozvoja. [online]. Ministerstvo životného prostredia: 2001 [cit. 11.9.2023]. Dostupné z : https://www.minzp.sk/files/dokumenty/strategicke-dokumenty/narodna-strategia-trvalo-udrzatelneho-rozvoja.pdf

[7] HAMMOND, Michael et al. 2015. Urban flood impact assessment. In Urbann Water Journal, vol. 12, no. 1, pp. 14-29. ISSN 1744-9006.

[8] WAGHWALA, Rupal, AGNIHOTRI, Prasit. 2019. Flood risk assessment and resilience strategies for flood risk management: A case study of Surat City. In International Journal of Disaster Risk Reduction, vol. 12, no. 1, pp. 14-29. ISSN 2212-4209.

[9] DUBCOVÁ, A. a kol. 2008. Geografia Slovenska. 1. vyd. Nitra: Univerzita Konštantína Filozofa, 2008. s. 351., ISBN 978-80-8094-422-3.
[10] Priemysel v Nitrianskom regióne. [online]. Slovenská obchodná a priemyselná komora: 2021 [cit. 1.3.2024]. Dostupné z : https://www.sopk.sk/nr/nezaradene/nitriansky-region/
[11] GREŽO, Henrich et al. 2020. Flood Risk Assessment for the Long-Term Strategic Planning Considering the Placement of Industrial Parks in Slovakia. In Sustainability, vol. 13, no. 6, pp. 1-22. ISSN 2071-1050
[12] Mapy povodňového rizika a mapy povodňového ohrozenie vodných tokov Slovenska. [online]. Slovenský vodohospodársky podnik: 2019 [cit. 8.1.2024]. Dostupné z: https://mpompr.svp.sk/klad
[13] What is Open Street Map?. [online]. CC-by OpenStreetMap: 2004 [cit. 15.1.2024]. Dostupné z: https://welcome.openstreetmap.org/what-is-openstreetmap/
[14] IHANTAMALALA, Felana et al. 2020. Improving geographical accessibility modeling for operational use by local health actors. In International Journnal of Health Geographics, vol. 12, no. 27, pp. 1-15. ISSN 1476-072X.
[15] Analýza priemyselných parkov v Slovenskej republike. [online]. Ministerstvo hospodárstva Slovenskej republiky: 2018 [cit. 29.1.2024]. Dostupné z: https://www.mhsr.sk/ministerstvo/centrum-pre-hospodarske-otazky/publikacie/analyzy/analyza-priemyselnych-parkov-v-sr
[16] DUBCOVÁ, Alena, KRAMÁREKOVÁ, Hilda, OREMUSOVÁ, Dáša. 2015. Program hospodárskeho rozvoja a sociálneho rozvoja združenia obcí Termál 2014-2020. 104 s.
[17] Nitriansky kraj – charakteristika regiónu. [online]. Štatistický úrad Slovenskej republiky: 2023 [cit. 2.3.2024]. Dostupné z: https://slovak.statistics.sk/wps/portal/ext/themes/regional/nitriansky%20kraj/news/!ut/p/z1/pZJda4MwFIZ_Sy-8XHJM1KS7Sx1Vh-tq_ajLzdDirFC1WDfZv59SYQy2bLBzd8jzkoeXgyVOsWyyt6rM-qptstO4P0nrOfG3fLXSBTgs0sHbbMI44QG1IoL3KuCBUiwVz4zOedsRrsF8AO47JnjCjXfLgFIQyvzn__DDCPhbXiH4n_wESLXeHktlRVODSiAyZmAdbolYGo59t3tcgxfZhIe-RQD0GVCV_JvmFQiYd3XgJoPRIYwBktAJXF0NiMjE91hWeY2GQ40AMXPJGSXEYgYzwNSnOxNNTnmJZVe8FF3RodduPL9j358vtxpoMAwDKtu2PBXo0NYafBc5tpcep19JfK7jcVKovMq7kfn7IBaLD5aiCMI!/dz/d5/L2dBISEvZ0FBIS9nQSEh
[18] Posudzovanie vplyvov na životné prostredie. [online]. Enviroportál: 2023 [cit. 29.12.2023]. Dostupné z: https://www.enviroportal.sk/eia/detail/program-hospodarskeho-rozvoja-socialneho-rozvoja-nitrianskeho-samospra-1
[19] Nitriansky región. [online]. Slovak Investment and Trade Developmnet Agency: 2023 [cit. 18.1.2024]. Dostupné z: https://portal.mhsr.sk/files/esluzby/COO/sario-nitriansky_region.pdf
[20] Nitriansky región. [online]. Slovenská agentúra pre rozvoj investícií a obchodu: 2023 [cit. 18.1.2024]. Dostupné z: https://www.sario.sk/sk/nitriansky-region-0
[21] Letecké laserové skenovanie. [online]. Úrad geodézie, kartografie a katastra Slovenskej republiky: 2022 [cit. 20.12.2023]. Dostupné z: https://www.geoportal.sk/sk/zbgis/lls/
[22] Územné a správne usporiadanie. [online]. Úrad geodézie, kartografie a katastra Slovenskej republiky: 2022 [cit. 20.12.2023]. Dostupné z: https://www.geoportal.sk/sk/zbgis/na-stiahnutie/
[23] Pripravte sa na VIANOČNÉ POVODNE. [online]. iMeteoSK: 2023 [cit. 28.12.2023]. Dostupné z: https://www.imeteo.sk/spravy/pripravte-sa-na-vianocne-povodne-sneh-sa-prudko-topi-bude-az-jarnych-15-0c
[24] Povodňová správa za rok 2022. [online]. Slovenský hydrometeorologický ústav: 2023 [cit. 28.12.2023]. Dostupné z: https://www.shmu.sk/File/ExtraFiles/povodnove_spravy/1682590368_2023-1_Povodnova_sprava_2022.pdf
[25] Staré Mapy. [online]. Ministerstvo životného prostredia Slovenskej republiky: 2023 [cit. 22.11.2023]. Dostupné z: https://www.staremapy.sk/?zoom=13&lat=48.162621870378366&lng=17.09107875819422&map=SR1952
[26] PASCHALIS, Evangelo et al. 2024. Can Reservoirs Combine Flood Protection and Irrigation? A Case Study for Larissa City, Greece. In Operation Research Forum, vol. 5, no. 16, pp. 1-19. ISSN 2662-2556.
[27] JULIÁ-PORTALÉS, Enrique et al. 2023. Global flood extent segmentation in optical satellite images. In

Scientific Reports, vol. 20, no. 13, pp. 1-14. ISSN 2045-2322.
[28] SAHA, Amit, AGRAWAL, Sonam. 2020. Mapping and assessment of flood risk in Prayagraj district, India: a GIS and remote sensing study. In Nanotechnology for Environmental Engineering, vol. 9, no. 1, pp. 1-18. ISSN 2365-6387.
[29] VERGARA-TENORIO, Mariá et al. 2010. La Conceptualización de las inundaciones y la percepción del riesgo ambiental. In Política y Cultura, vol. 4, no. 36, pp. 45-69. ISSN 0188-7742.
[30] SREEKALA, Salel et al. 2023. Flood Susceptibility Map of Periyar River Basin Using Geo-spatial Tecnology and Machine Learning Approach. In Remote Sensing in Earth Systems Sciences, vol. 6, no. 3, pp. 1-21. ISSN 2520-8209.
[31] CHITHRA, Kurukkanari et al. 2024. Modeling flood susceptibility on the onset of the Kerala floods of 2018. In Environmental Earth Sciences, vol. 83 , no. 123 , pp. 1-22. ISSN 1866-6299.
[32] Kataster nehnuteľností. [online]. Geodetický a kartografický ústav Bratislava: 2020 [cit. 28.12.2023]. Dostupné z: https://www.gku.sk/gku/produkty-sluzby/kataster-nehnutelnosti/

Štruktúrna a spektrálna charakterizácia komplexov Cu(II) obsahujúcich bioaktívny N-donorový ligand

Structural and spectral characterization of Cu(II) complexes containing a bioactive N-donor ligand

Michaela Červeňáková[1] – Ján Titiš[1]
Školiteľ: Ján Titiš[1]
[1]Fakulta prírodných vied, UCM, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava
cervenakova2@ucm.sk, jan.titis@ucm.sk

Abstrakt
Cieľom práce bola syntéza dvoch Cu(II) komplexov, ktoré vo svojich štruktúrach obsahujú bidentátny ligand 4,4´-dimetoxy-2,2´-bipyridín. Pripravené zlúčeniny boli charakterizované radom experimentálnych techník (IR, UV-VIS, EPR, prvková CHN analýza). Ich molekulová a kryštálová štruktúra bola určená metódou monokryštálovej RTG analýzy. Elektrónová štruktúra komplexov a ich spektrálne vlastnosti boli modelované pomocou moderných kvantovo-chemických výpočtov. Bola vykonaná molekulovo-dynamická simulácia interakcie komplex-DNA použitím hybridnej metódy B3LYP/XTB2.

Kľúčové slová: komplex Cu(II), interakcia komplex-DNA, 2,2´-bipyridín, magento-bioaktivita, spektroskopia

Abstract
The aim of the work was the synthesis of two Cu(II) complexes, which contain the bidentate ligand 4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine in their structures. The prepared compounds were characterized by a number of experimental techniques (IR, UV-VIS, EPR, elemental CHN analysis). Their molecular and crystal structure was determined by the method of single crystal X-ray analysis. The electronic structure of the complexes and their spectral properties were modeled using modern quantum-chemical calculations. A molecular dynamic simulation of the complex-DNA interaction was performed using the hybrid B3LYP/XTB2 method.

Key Words: Cu(II) complex, complex-DNA interaction, 2,2'-bipyridine, magento-bioactivity, spectroscopy

Úvod

V súčasnosti nemožno pochybovať o potrebe vývoja nových terapeutických látkok v boji proti mnohým vírusom, superrezistentým baktériám, či nádorovým ochoreniam [1]. Práve moderná anorganická chémia poskytuje rôzne kľúčové riešenia v tomto smere. Historickým príkladom môže byť napr. cisplatina (*cis*-diammin-dichloridoplatnatý komplex), ako jedno z najvýznamnejších chemoterapeutík vôbec schválené v r. 1978. V neskoršom obdobý sa výskum v tejto oblasti zameral na analógy cisplatiny, ako aj na komplexy iných prechodných kovov, ako je Pt(II). Zvýšená pozornosť bola venovaná predovšetkým zlúčeninám na báze medi [1,2].

Meď patrí medzi najvýznamnejšie stopové prvky, je prítomná vo všetkých živých organizmoch, v ktorých zohráva množstvo významných úloh [2,3]. Je napr. súčasťou metaloenzýmu superoxiddismutázy (SOD), ktorý poskytuje orgamizmu ochranu voči oxidačnému stresu. Z tohto dôvodu sú mnohé Cu(II) komplexy skúmané ako modelové systémy SOD (SOD mimetiká) schopné zachytiť toxický superoxidový radikál ($O_2^{\cdot -}$) a ovplyvniť tak proliferáciu nádorových buniek [4-6]. Ďalšiu triedu komplexov predstavujú štruktúry obsahujúce vhodné ligandové systémy schopné interagovať s biomolekulami, vrátane nukleových kyselín. Takéto správanie je špecifické a mimoriadne dôležité pre vývoj látok s potenciálnou antitumorovou, antivírusovou a animikrobiálnou aktivitou [7-13]. V tomto prípade je vhodným príkladom skupina liečiv označované ako Casiopeinas, ktoré vykazujú významné antineoplastické účinky. Ide o liečivá na báze komplexov Cu(II) typu $[Cu(N\text{-}N)(O\text{-}O)]NO_3$ a $[Cu(N\text{-}N)(N\text{-}O)]NO_3$, kde N-N sú substituované 2,2'-bipyridíny alebo 1,10-fenantrolíny (primárne ligandy), O-O je acetylacetonát alebo salicylaldehydy a N-O môžu byť aminokyseliny (sekundárne ligandy) [14].

Antineoplastická aktivita komplexov spočíva v ich schopnosti interagovať so štruktúrou DNA (kyselina deoxyribonukleová) predovšetkým prostredníctvom interkalačného mechanizmu. Ide o vsunutie planárnej organickej časti malej molekuly medzi nukleobázy DNA

nádorovej bunky, čím sa narušuje jej štruktúra a funkcia. Výsledná interakcia je dôsledkom štruktúrnej rozmanitosti ligandov, ako aj chemickej povahy centrálneho atómu daného komplexu [15]. Je preto zrejmé, že detailná znalosť mechanizmu interakcie komplex-DNA je rozhodujúca z hľadiska posúdenia biologickej aktivity určitej koordinačnej zlúčeniny [16].

Mnohé komplexy prechodných kovov obsahujú nesparené elektróny, čo sa premieta do ich významných magnetických vlastností [17]. Atóm Cu(II) má elektrónovú konfiguráciu d^9 a teda v jeho valenčných 3d orbitáloch sa nachádza jeden nespárený elektrón (S = 1/2). Boli napr. pripravené Cu(II) komplexy, ktoré sa radia medzi jednomolekulové /jednoiónové magnety [18]. V tomto kontexte preto možno vysloviť hypotézu prípravy nových multifunkčných látok, ktoré by vhodne kombinovali bioaktivitu komplexných molekúl s ich magnetoaktivitou. Potenciálne využitie takýchto látok je širokospektrálne, napr. v nanobiotechnológiách, v bunkovej biológií, biofyzike, bioelektronike, či v medicíne [19].

Táto práca je zameraná na prípravu dvoch komplexov Cu(II) s obsahom 4,4´-dimetoxy-2,2´-bipyridínu (L) a charakterizáciu ich štruktúry a spektrálnych vlastností. Nedávne štúdie preukázali, že práve Cu(II) komplexy obsahujúce ligandy typu 2,2´-bipyridínu môžu vykazovať zaujímavé biologické vlastnosti [20-22].

1 Použité metódy

Všetky východiskové reaktanty a rozpúšťadlá boli zakúpené z komerčných zdrojov. Ako zdroj centrálneho atómu boli použité anorganické soli $CuCl_2{\cdot}2H_2O$ a $Cu(NO_3)_2{\cdot}3H_2O$. Ako ligand bol použitý 4,4´-dimetoxy-2,2´-bipyridín (L).

Príprava $[CuLCl_2]$ 1. Východiskové látky, 1 mmol $CuCl_2{\cdot}2H_2O$ a 1 mmol 4,4´-dimetoxy-2,2´-bipyridín, sa rozpustili v 25 cm^3 metanolu. Reakčná zmes bola zahrievaná pri teplote 64,7 °C za kontinuálneho miešania po dobu 4 hodín. Počas priebehu reakcie bola pozorovaná zmena sfarbenia roztoku z tyrkysovo zelenej na zelenú. Po prefiltrovaní sa roztok nechal voľne kryštalizovať pri laboratórnej teplote. Prvková analýza (exp/calc %): C 39,3/41,1; H 3,60/3,45; N 7,89/7,99. IR ($\tilde{\nu}$ cm^{-1}): 2358, 2353, 1608, 1556, 1494, 1257, 1230, 1041, 1022, 883, 825, 736, 580, 528.

Príprava $[CuL(H_2O)_2(NO_3)_2]$ 2. Východiskové látky, 1 mmol $Cu(NO_3)_2{\cdot}3H_2O$ a 1 mmol 4,4´-dimetoxy-2,2´-bipyridín, sa rozpustili v 25 cm^3 etanolu. Reakčná zmes bola zahrievaná pri teplote 78,3 °C za kontinuálneho miešania po dobu 4 hodín. Po prefiltrovaní sa roztok nechal voľne kryštalizovať pri laboratórnej teplote. Prvková analýza (exp/calc %): C 30,77/31,48; H 3,92/3,96; N 12,27/12,24. IR ($\tilde{\nu}$ cm^{-1}): 3089, 2453, 2358, 2341, 1610, 1560, 1500, 1469, 1386, 1305, 1228, 1041, 877, 837, 719, 578, 433.

Na stanovenie percentuálneho zastúpenia prvkov (C,H,N) vo vzorkách bol použitý prístroj Flash 2000 CHNS (Thermo Scientific). Benchtop EPR-5000 spektrometer bol použitý na meranie spektier elektrónovej paramagnetickej rezonancie (EPR), pričom meranie sa uskutočnilo pri laboratórnej teplote v X-pásme. Infračervené spektrá sa merali v tuhej fáze v oblasti 4000 - 400 cm^{-1} na FTIR spektrofotometri s ATR nástavcom Shimadzu Iraffinity-1. Na meranie elektrónových spektier bol použitý UV-VIS spektrofotometer 50 Bio/Varian, pričom meranie sa uskutočnilo v oblasti vlnových dĺžok 200 - 800 nm v roztoku metanolu.

Dáta pre monokryštálovú difrakčnú analýzu sa získali pomocou difraktometra Stoe StadiVari s plošným detektorom PILATUS3R 300K a s mikrofokusovanou RTG lampy Xenocs FOX3D Cu HF. Meranie prebiehalo pri laboratórnej teplote.

Všetky kvantovo-chemické výpočty sa uskutočnili pomocou programového balíka ORCA 5.0.4 [23] pre experimentálne štruktúry komplexov **1** a **2**. Elektrónové spektrá (UV-VIS) a spektrá elektrónovej paramagnetickej rezonancie (EPR) sa vypočítali na úrovni teórie funkcionálov hustoty (DFT) použitím výmenno-korelačnoho funkcionálu PBE0. Bola použitá výpočtová báza CP(PPP) pre atóm Cu(II) a def2-TZVP pre všetky ostatné prvky. Relativistické efekty boli do výpočtov zahrnuté prostredníctvom metódy ZORA. Molekulovo-dynamické simulácie interakcie komplex-DNA boli realizované pomocou hybridnej metódy B3LYP/XTB2.

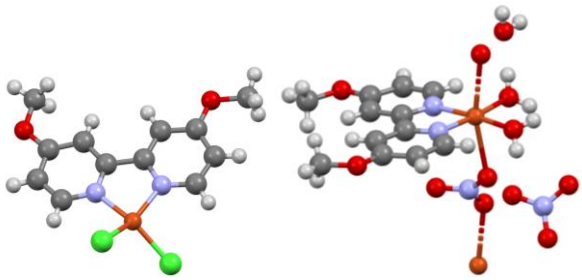
2 Výsledky a diskusia

Reakciou 4,4´-dimetoxy-2,2´-bipyridínu s anorganickými soľami $CuCl_2{\cdot}2H_2O$, resp. $Cu(NO_3)_2{\cdot}3H_2O$ v metanolovom, resp. etanolovom roztoku sa pripravili dve koordinačné zlúčeniny. Obe zlúčeniny kryštalizujú v trigonálnej sústave s priestorovou grupou P -1 (Tab. 1).

Tab. 1 Základné kryštalografické charakteristiky a štruktúrne parametre študovaných komplexov

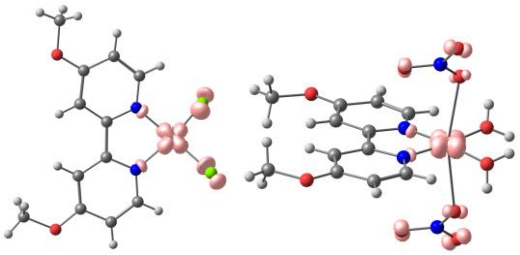
	1	**2**
Kryšt. sústava	Triklinická	Triklinická
Priest. grupa	P-1	P-1
V /Å^3	656,87	856,09
a /Å	7,49	7,05
b /Å	9,03	10,52
c /Å	11,54	12,38
Cu-N /Å	1,988	1,981
Cu-Cl /Å	2,221	-
Cu-O_{voda} /Å	-	1,948
Cu-$O_{dusičnan}$ /Å	-	2,593

Ich molekulová štruktúra je tvorená jednojadrovým komplexom Cu(II) so vzorcovými jednotkami $[CuLCl_2]$ **1** a $[CuL(NO_3)_2(H_2O)_2]$ **2** (Obr. 1). V oboch prípadoch sa jedna molekula 4,4´-dimetoxy-2,2´-bipyridínu koordinuje na centrálny atóm Cu(II) chelátovo prostredníctvom dusíkových donorových atómov. V štruktúre **1** je koordinačná sféra doplnená dvomi chloridovými aniónmi, ktoré kompenzujú kladný náboj Cu(II). Atóm Cu(II) je teda tetrakoordinovaný. Stredné hodnoty medzijadrových vzdialeností v rámci chromofóru $\{CuN_2Cl_2\}$ sú Cu-N 1,98 a Cu-Cl 2,22 Å, čo sú hodnoty typické pre komplexy Cu(II). Roviny atómov N-Cu-N a Cl-Cu-Cl zvierajú uhol 40,4°. Symetria štruktúry chromofóru komplexu **1** bola hodnotená pomocou programu SHAPE. Vypočítané hodnoty porovnávacích faktorov vzhľadom na ideálny štvorec, resp. tetraéder sú nasledovné: 6,9 (SP-4) a 13,6 (T-4). Je teda evidentné, že štruktúra **1** je bližie k štvorcu (SP-4 < T-4).

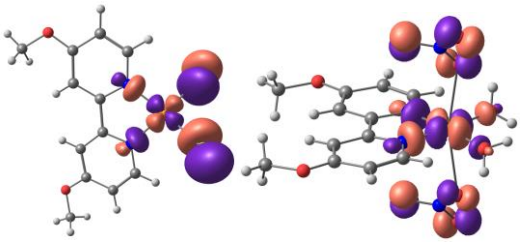


Obr. 1 Molekulová štruktúra komplexov **1** (vľavo) a **2** (vpravo).

V prípade komplexu **2** je situácia komplikovanejšia. Koordinačná sféra je tu doplnená molekulami vody, ktoré sú koordinované pri vzdialenosti 1,95 Å (Cu-N 1,98 Å). Zo štruktúry **2** sa navyše javí, že zvyšné koordinačné miesta sú obsadené dusičnanovými aniónmi kompenzujúcimi náboj Cu(II), avšak pri vzdialenostiach Cu-O až ~2,6 Å. Nie je preto na prvý pohľad jasné, či sa jedná o tetrakoordinovanú alebo hexakoordinovanú štruktúru. Z tohto hľadiska je preto kľúčové posúdenie väzbových charakteristík kov-ligand v rámci chromofóru komplexu **2**. Na úrovni teórie PBE0/CP(PPP)/ZORA-def2-TZVP boli preto vypočítané Wibergove väzbové poriadky (WBO), ktoré pre štruktúru **2** sú: WBO(Cu-N) = 0,49; WBO(Cu-O_{voda}) = 0,42; WBO(Cu-$O_{dusičnan}$) = 0,19. Hodnoty WBO pre väzby Cu-N a Cu-O_{voda} sú typické pre koordinačnú väzbu. WBO pre väzbu Cu-$O_{dusičnan}$ je výrazne nižšie, avšak stále naznačuje istý malý stupeň kovalencie.



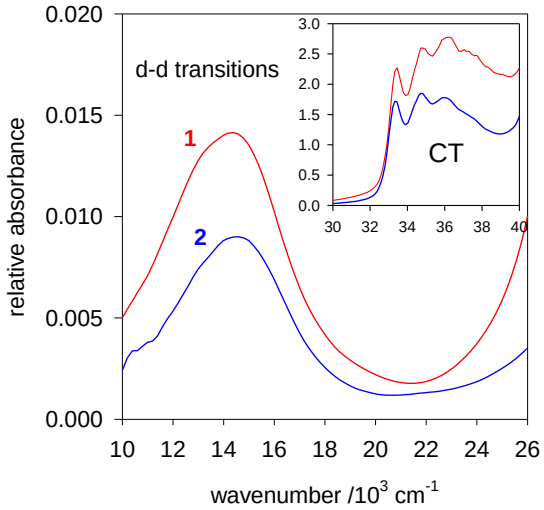
Obr. 2 Rozloženie spinovej hustoty v komplexoch **1** (vľavo) a **2** (vpravo).



Obr. 3 Najvyšší obsadený molekulový orbitál (HOMO) v komplexoch **1** (vľavo) a **2** (vpravo).

Situácia v prípade komplexu **1** je nasledovná: WBO(Cu-N) = 0,51; WBO(Cu-Cl) = 0,81. Na väzbu Cu-$O_{dusičnan}$ je teda možné nazerať ako na slabú koordinačnú väzbu s dominantným príspevkom elektrostatickej interakcie. Túto hypotézu potvrdzuje aj rozloženie spinovej hustoty, kde v komplexe **2** je evidentná jej výrazná delokalizácia na dusičnanové anióny (Obr. 2 a 3). Zároveň je táto skutočnosť viditeľná aj zo zloženia HOMO orbitálu komplexu obsadeného nespáreným elektrónom, ktorý je charakteru dx^2-y^2 s výrazným zapojením hraničných orbitálov NO_3^- ligandov π-symetrie (Obr. 3).

Elektrónové spektrá komplexov boli namerané v metanolovom roztoku a sú zobrazené na Obr. 4.



Obr. 4 Elektrónové spektrum v UV-VIS oblasti komplexov **1** a **2** merané v roztoku CH_3OH.

Namerané spektrá možno interpretovať v idealizovanej O_h, resp. D_{4h} symetrii. Oktaédrické termy konfigurácie d^9 sú identické s termami konfigurácie d^4, nakoľko sú odvodené od rovnakého atómového termu D. Hypotetický základný term $^2E_g(Oh)$ je silne štiepený efektom Jahna-Tellera. V roztokových spektrách sa bežne objavuje slabý pás v blízkej IR oblasti pri hohnote 7000 cm^{-1} (D_{4h}: $^2B_{1g} \rightarrow {}^2A_{1g}$). Ďalej možno identifikovať široký pás pri 12000 cm^{-1} (D_{4h}: $^2B_{1g} \rightarrow {}^2E_g+{}^2B_{2g}$). Prvý pás je jahnov-tellerovský prechod medzi dvoma listami adiabatického potenciálu. Sila kryštálového poľa sa môže odhadnúť na hodnotu ~8500 cm^{-1}. Tetraédrické Cu(II) komplexy majú inverzný termový diagram vzhľadom na oktaédrické komplexy konfigurácie d^1 a základný, ako aj excitovaný stav v T_d geometrii je orbitálne degenerovaný. V tomto prípade sa v spektre tiež objavujú dva d-d prechody pri 9000 cm^{-1} (D_{2d}: $^2B_2 \rightarrow {}^2E$) a pri 12000 cm^{-1} (D_{2d}: $^2B_2 \rightarrow {}^2A_1$).

V prípade komplexov **1** a **2** je evidentná podobnosť v nameraných spektrách. V oboch prípadoch je možné v oblasti 12000 – 16000 cm^{-1} identifikovať široký a málo intenzívny pás, čo je typické pre d-d prechody. Výrazne intenzívnejší široký pás sa nachádza v oblasti nad 32000 cm^{-1}. V tejto oblasti sa nachádza systém výrazných píkov, ktoré prislúchajú prechodom prenosu náboja (CT).

Pre oba komplexy boli vypočítané elektrónové prechody pomocou časovo závislej DFT metódy (TDDFT), čo umožňuje interpretáciu nameraných spektier v kontexte teórie molekulových orbitálov. Aj v prípade vypočítaných spektier badať výraznú podobnosť pre komplexy **1** a **2**. d-d prechody (D_{4h}: $^2B_{1g} \rightarrow {}^2E_g+{}^2B_{2g}$) tu možno identifikovať v oblasti 13000 – 14000 cm^{-1}. Sú tvorené sériou jednoelektrónových prechodov s dominantným príspevkom od prechodu medzi dvojnásobne obsadeným d-orbitálom a orbitálom dx^2-y^2 obsadeným jedným elektrónom. V oblasti 30000 – 40000 cm^{-1} sa vo vypočítaných spektrách nachádzajú CT prechody tvorené príspevkami od prechodov medzi obsadenými d-orbitálmi Cu(II) a prázdnymi orbitálmi ligandu L. Ide teda o CT prechody typu M→L. Pre komplex **2** sa vykonal ďalší výpočet so štruktúrou s vynechanými dusičnanovými aniónmi ($[CuL(H_2O)_2]^{2+}$) simulovanou v prostredí metanolového roztoku. Vychádzalo sa pri tom z predpokladu, že komplex **2** bude v roztoku tvoriť primárne štvorcové štruktúry. V prípade CT prechodov sa neodhalili výraznejšie rozdieli oproti predchádzajúcemu výpočtu, avšak d-d prechody sa posunuli do oblasti 16000 – 17000 cm^{-1}.

Spektrá EPR pre komplexy **1** a **2** boli namerané v tuhej fáze (Obr. 5). Takéto spektrá priamo odrážajú prechody medzi spinovými hladinami a možno ich použiť na interpretáciu magnetických vlastností komplexov.

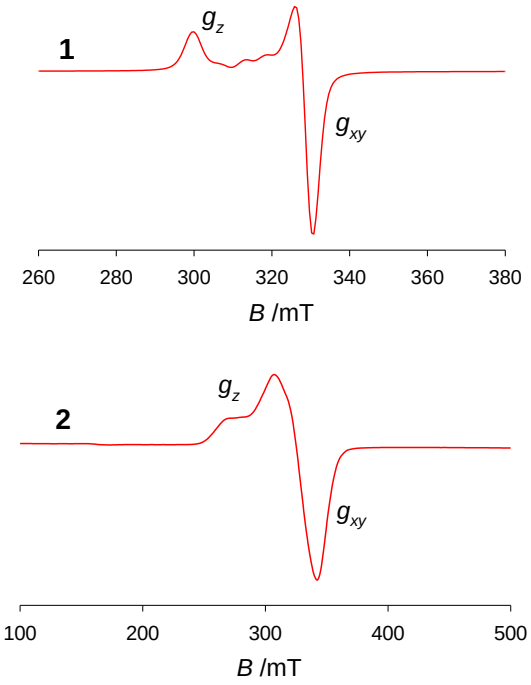
Oktaédrické komplexy Cu(II) sú hypotetické, pretože v tejto geometrii sa uplatňuje efekt Jahna-Tellera vedúci k tetragonálnej alebo rombickej distorzii. Výsledkom sú dva Kramersove dublety, pričom EPR signál sa pozoruje pre energeticky nižší dublet. Navyše, jadrový spin I(Cu) = 3/2 prináša štrukturované energetické hladiny, čo sa v spektre prejaví prítomnosťou hyperjemých čiar. Ďalšiu štruktúru spektra spôsobuje spin iných priľahlých jadier (napr. jadra dusíka) v podobe super-hyperjemného štiepenia.

Namerané EPR spektrá vykazujú profil typický pre axiálne systémy a potvrdzujú paramagnetický charakter komplexov **1** a **2**. V spektre komplexu **1** vidieť nevýrazné štruktúrovanie, čo naznačuje prítomnosť hyperjemnej interakcie, avšak tento detail je len málo rozlíšený. Podobné črty v spektre komplexu **2** absentujú. Bola vykonaná simulácia spektier pomocou spinového hamiltoniánu

$$\hat{H} = \mu_B \hbar^{-1} g_{\parallel} B_z \hat{S}_z + \mu_B \hbar^{-1} g_{\perp} (B_x \hat{S}_x + B_y \hat{S}_y) \quad (1)$$

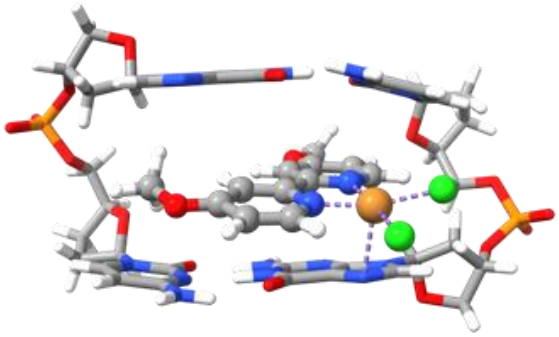
ktorý obsahuje len spinový Zeemanov člen. V tomto hamiltoniáne vystupujú ako parametre zložky g-faktora $g_{\parallel}(g_z)$ a $g_{\perp}(g_{xy})$. Simuláciou sa získali hodnoty: g_z = 2,25; g_{xy} = 2,05 pre **1** a g_z = 2,40; g_{xy} = 2,10 pre **2**. Pre **1** ide o hodnoty typické pre štvorcový systém, zatiaľčo pre **2** sú získané hodnoty typické pre predĺženú bipyramídu. Následne sa vykonali DFT výpočty, ktoré poskytli

hodnoty ($A_{x,y,z}$ – zložky tenzora hyperjemnej interakcie): g_x = 2,04; g_y = 2,05; g_z = 2,17; A_x = -116; A_y = -127; A_z = -634 MHz pre **1**, g_x = 2,06; g_y = 2,07; g_z = 2,20; A_x = -69; A_y = -78; A_z = -736 MHz pre **2**. V prípade komplexu **1** sú vypočítané hodnoty porovnateľné s experimentálnymi, avšak pre komplex **2** sú rozdieli väčšie.



Obr. 5 EPR spektrá komplexov **1** a **2** merané v X-pásme pre tuhé vzorky.

Pre komplex **1** sa vykonala molekulovo-dynamická (MD) simulácia interakcie komplex-DNA. Pre potreby tejto simulácie sa v programe Hyperchem skonštruovala zjednodušená štruktúra DNA obsahujúca dve sekvencie nukleobáz cytozín(C)-guanín(G). Vzdialenosti dusíkatých báz jednotlivých sekvencií boli nastavené na hodnotu ~7Å, čím sa simulovala deformácia štruktúry DNA vplyvom interkalácie komplexu. Samotná MD simulácia sa vykonala pomocou hybridnej metódy B3LYP/XTB2 pre 2000 krokov pri T = 300 K. Výslekok simulácie je znázornený na Obr. 6, pričom sa odhalilo, že komplex **1** sa viaže na štruktúru DNA prostredníctvom koordinácie dusíkového atómu guanínového fragmentu (Cu-N7_G 2,5 Å).



Obr. 6 Molekulovo-dynamická simulácia interakcie komplex **1** – DNA pri T = 300 K.

Záver

Boli pripravené dve nové Cu(II) komplexné zlúčeniny. Kryštálové štruktúry komplexov **1** a **2** boli určené monokryštálovou röntgenovou difrakčnou analýzou, pričom komplex **1** vykazuje charakteristickú štvorcovú geometriu a komplex **2** pseudo-oktaédrické usporiadanie. Ligand 4,4´-dimetoxy-2,2´-bipyridín je v oboch komplexoch viazaný bidentátnym spôsobom na ión Cu(II) prostredníctvom dvoch atómov dusíka.

Spektrálne vlastnosti pripravených komplexov Cu(II) boli charakterizované rozličnými metódami, akými sú IR, UV-VIS, EPR. Elektrónové spektrá merané v UV-VIS oblasti priamo odrážajú elektrónové prechody v komplexoch. V prípade komplexov **1** a **2** možno nájsť široký avšak malo intenzívny pás v oblasti 12000 – 16000 cm^{-1}, čo je charakteristické pre d-d prechody. Výrazne intenzívny široký pás bol pozorovaný v oblasti nad 32000 cm^{-1}, čo svedčí o prechode prenosu náboja (CT) typu M→L, teda prechodu z obsadených orbitálov centrálneho atómu do neobsadených molekulových orbitálov daného ligandu. EPR spektrá mednatých komplexov majú profil typický pre axiálne systémy, čo svedčí o ich paramagnetickom charaktere.

Interkalácia komplexu **1** do štruktúry DNA sa študovala pomocou molekulovo-dynamickej simulácie, ktorá odhalila, že komplex sa viaže na DNA prostredníctvom koordinácie dusíkového atómu guanínového fragmentu pri vzdialenosti 2,5 Å.

Poďakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore agentúry VEGA (VEGA 1/0086/21). Poďakovanie patrí aj Dr. E. Samoľovej za nameranie kryštalografických dát a riešenie štruktúr, ako aj školiteľovi prof. J. Titišovi.

Použitá literatúra

[1] Romano, S.; Guerreiro, J.P.; Rodrigues, A.T. Drug shortages in community pharmacies: Impact on patients and on the health system. *J. Am. Pharm. Assoc.* **2022**, *62*, 791–799.

[2] Papadopoulos, Z.; Doulopoulou, E.; Zianna, A.; Hatzidimitriou, A.G.; Psomas, G. Copper(II) Complexes of 5–Fluoro–Salicylaldehyde: Synthesis, Characterization, Antioxidant Properties, Interaction with DNA and Serum Albumins. *Molecules* **2022**, *27*, 8929. https://doi.org/10.3390/molecules27248929

[3] Balsano, C.; Porcu, C.; Sideri, S. Is copper a new target to counteract the progression of chronic diseases? *Metallomics* **2018**, *10*, 1712–1722.

[4] Uauy, R.; Olivares, M.; Gonzalez, M. Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *67*, 952S–959S.

[5] Milanino, R.; Buchner, V. Copper: Role of the 'Endogenous' and 'Exogenous' Metal on the Development and Control of Inflammatory Processes. *Rev. Environ. Health* **2006**, *21*, 153–215.

[6] Psomas, G. Copper(II) and zinc(II) coordination compounds of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Structural features and antioxidant activity. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *412*, 213259.

[7] Khalid, H.; Hanif, M.; Hashmi, M.; Mahmood, T.; Ayub, K.; Monim-ul-Mehboob, M. Copper Complexes of Bioactive Ligands with Superoxide Dismutase Activity. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1944–1956.

[8] Zalevskaya, O.A.; Gur'eva, Y.A. Recent Studies on the Antimicrobial Activity of Copper Complexes. *Russ. J. Coord. Chem.* **2021**, *47*, 861–880.

[9] McGuire, K.L.; Smit, P.; Ess, D.H.; Hill, J.T.; Harrison, R.G.; Busath, D.D. Mechanism and Kinetics of Copper Complexes Binding to the Influenza A M2 S31N and S31N/G34E Channels. *Biophys. J.* **2021**, *120*, 168–177.

[10] Zhang, W.; Huang, D.; Huang, M.; Huang, J.; Wang, D.; Liu, X.; Nguyen, M.; Vendier, L.; Mazères, S.; Robert, A.; et al. Preparation of Tetradentate Copper Chelators as Potential Anti-Alzheimer Agents. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 684–704.

[11] Leuthauser, S.W.C.; Oberley, L.W.; Oberley, T.D.; Sorenson, J.R.J.; Ramakrishna, K. Antitumor Effect of a Copper Coordination Compound With Superoxide Dismutase-Like Activity. *J. Nat. Cancer Inst.* **1981**, *66*, 1077–1081.

[12] Denoyer, D.; Masaldan, S.; La Fontaine, S.; Cater, M.A. Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. *Metallomics* **2015**, *7*, 1459.

[13] Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM. Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach. Mol Biol Int. 2011;**2011**:594529. doi: 10.4061/2011/594529.

[14] Rivero-Muller, A.; Vizcaya-Ruiz, A.; Plant, N.; Ruiz, L.; Dobrota, M. Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. *Chem.Biol. Interact.* **2007**, *165*, 189–199.

[15] Nick Hadjiliadis (Editor), Einar Sletten (Co-Editor), Metal Complex - DNA Interactions, 2009 Wiley-Blackwell 544 p. ISBN: 978-1-444-31208-9 8.

[16] Varghese N., Jose J.R., Krishna P.M., Philip D., Joy F., Vinod T.P., Prathapachandra Kurup M.R., Nair Y., In vitro Analytical Techniques as Screening Tools to investigate the Metal chelate-DNA interactions, (2023) ChemistrySelect, 8 (5), art. no. e202203615.

[17] Guo F.-S., Bar A.K., Layfield R.A., Main Group Chemistry at the Interface with Molecular Magnetism, (2019) Chemical Reviews, 119 (14), pp. 8479 – 8505. DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00103

[18] Price P.M., Mahmoud W.E., Al-Ghamdi A.A., Bronstein L.M., Magnetic drug delivery: Where the field is going, (2018) Frontiers in Chemistry, 6 (DEC), art. no. 619. DOI: 10.3389/fchem.2018.00619

[19] Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Inactivation of influenza A virus on copper versus stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology.* 2007;73(8):2748–2750.

[20] Alp M, Yurdakul S, Erdem B. Experimental and Theoretical Vibrational Spectroscopic Investigations, DFT quantum chemical analysis, Biological activities and Molecular docking on 4,4'-Dimethoxy-2,2'-Bipyridine. *Journal of Molecular Structure.* 2022; v. 1260, 132846.

[21] Zhang, CL., Cai, DH., Chen, S. *et al.* Synthesis, DNA interaction and SOD-like activities of copper(II) complexes: investigation of their DNA-interaction mechanism. *Transit Met Chem* **44**, 603–613 (2019). https://doi.org/10.1007/s11243-019-00320-8.

[22] Palmeira-Mello, M.V., Caballero, A.B., Lopez-Espinar, A. *et al.* DNA-interacting properties of two analogous square-planar *cis*-chlorido complexes: copper versus palladium. *J Biol Inorg Chem* **26**, 727–740 (2021). https://doi.org/10.1007/s00775-021-01888-2.

[23] Neese, F. (2012) The ORCA program system, Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci., 2, 73-78.

Návrh aktivít na rozvoj informatického a matematického myslenia v neformálnom vzdelávaní

Design of activities for the development of computational and mathematical thinking in informal education

Michal Fojtík[1]
Školiteľ: Janka Medová[1]
[1]Katedra matematiky, FPVaI UKF, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,
michal.fojtik@ukf.sk, jmedova@ukf.sk

Abstrakt
Žijeme v dobe grafov, prezentácií, webových stránok a iných technológií. Dnes je dôležitejšie ako kedykoľvek predtým rozvíjať u všetkých ľudí informatické myslenie a matematické myslenie nie len u ľudí, ktorých pracovné alebo vzdelávacie zameranie je v informatike alebo matematike. V tomto príspevku opisujeme priebeh ôsmich aktivít zameraných na rozvoj informatického a matematického myslenia pre žiakov nižšieho sekundárneho vzdelávania. Prvé dve sú zamerané na skôr na matematické myslenia s podporou informatického myslenia a nasledujúcich šesť aktivít je zameraných na informatické myslenie s podporou matematického myslenia. Na podporu matematického myslenia používame zaujímavé aktivity z pravdepodobnosti a kombinatoriky. A na rozvoj informatického myslenia používame zariadenie BBC micro:bit, ktoré deti môžu programovať blokovým programovaním.

Kľúčové slová: matematické myslenie, informatické myslenie, BBC micro:bit

Abstract
We live in times of diagrams, presentations, websites, and other technologies. Today is more important than ever to develop computational and mathematical thinking in everyone, not just in people whose work or education is in some way focused on informatics or mathematics. In this contribution, we describe the course of eight activities focused on developing computational and mathematical thinking for pupils of lower secondary education. The first two of them are focused on mathematical thinking with the support of computational thinking. Next, six activities are focused on computational thinking with the support of mathematical thinking. We use attractive activities focused on probability and combinatorics to develop mathematical thinking. And we use the BBC micro:bit device, which pupils can program with block programming to develop computational thinking.

Key Words: mathematical thinking, computational thinking, BBC micro:bit

Úvod

Jeannette M. Wing definuje informatické myslenie ako určité myšlienkové procesy, ktoré ľuďom pomáhajú formulovať problémy tak, aby ich riešenia boli vykonateľné ľuďmi, počítačmi alebo kombináciou ľudí a počítačov, resp. strojov [1]. Informatické myslenie je zručnosť, ktorú by nemali mať iba informatici, či učitelia informatiky, ale všetci ľudia. Je to dôležité hlavne kvôli aspektom informatického myslenia ako sú algoritmické myslenie či abstrakcia, ale aj iným [2]. Tieto aspekty informatického myslenia sú nevyhnutné pre život každého človek vo svete, v ktorom sú grafy, počítače a iné technické pomôcky nevyhnutnou súčasťou našich životov [3]. Medzi aspekty informatického myslenia patria [4]: abstrakcia – tvorba modelu zjednodušovaním reality odstraňovaním nepodstatných detailov [3], algoritmické myslenie – riešenie problému, pomocou postupu krokov [3], automatizácia – zavádzanie používania strojov na činnosti, ktoré vykonávajú efektívnejšie ako ľudia [5, 6], dekompozícia – rozkladanie problému na časti, pre lepšie porozumenie problému [7], odstraňovanie chýb

– interaktívny kognitívny proces, ktorý sa používa, keď riešenie problému nedosiahne požadovaný výsledok [8] a zovšeobecnenie – tvorba všeobecne platných postupov a vzorcov na riešenie určitej skupiny problémov [3, 9]. Medzi spoločné prvky informatického a matematického myslenia patria: riešenie problémov, analýza a interpretácia údajov, modelovanie, pravdepodobnosť a štatistika [10].

Je iba málo intervenčných štúdií, v ktorých sa matematické a informatické myslenie rozvíjajú súčasne. V rámci projektu APVV Intervenčný program v prírodných vedách a matematike je na FPVaI UKF v

Nitre organizovaná séria krúžkov pre deti z druhého stupňa ZŠ, na tvorbe a realizácii niektorých sa autor príspevku podieľal.

Vzhľadom na to, že organizované voľnočasové aktivity sú určené pre žiakov rôznych ročníkov nižšieho sekundárneho vzdelávania (6.-9. ročník), je treba voliť ako náplň obsah vyučovacích predmetov, ktorý nie je súčasťou štátneho vzdelávacieho programu. V našich krúžkoch sme sa zamerali na aktivity súvisiace s kombinatorikou, pravdepodobnosťou a štatistikou, hlavne na to, aby žiaci realizovali náhodné pokusy, zaznamenávali ich výsledky a snažili sa formulovať závery na neformálnej úrovni pravdepodobnostného dôvodenia, pretože práve skúsenosť s realizáciou a analýzou výsledkov náhodných pokusov má pozitívny vplyv na úroveň pravdepodobnostného dôvodenia žiakov [11,12]. Súčasne sme na zber údajov alebo ich generovanie využili počítač. Aktivity boli taktiež zameriavané na rozvoj kompetencií informatického myslenia. Aktivity so zariadením BBC micro:bit sa zameriavajú na jednotlivé aspekty tohto druhu myslenia. Tvorba kódov ako taká je podstatou algoritmického myslenia (algoritmické myslenie a automatizácia). Niektoré problémy sú príliš zložité aby boli vyriešené vcelku, preto musia byť rozložené na menšie (dekompozícia) a pri ich riešení často dochádza k chybám, logickým alebo vyplývajúcim z procesu tvorenia (odstraňovanie chýb). Pri tvorbe kódu treba často zanedbávať nepodstatné detaily z reálneho sveta (abstrakcia). Viaceré problémy sa riešia podobným spôsobom (zovšeobecnenie). Aktivity na krúžkoch sa zameriavali na tieto vlastnosti.

Krúžky sme organizovali dve kategórie:

- Matematické (M) krúžky s informatickým myslením (IM)
- Informatické krúžky zamerané na informatické myslenie s matematikou

1 Matematické krúžky s výpočtovým myslením

Matematické krúžky s výpočtovým myslením boli dva. Boli zamerané na prácu s náhodou (organizovateľnou a neorganizovateľnou náhodou).

1.1 Organizovateľná náhoda

Oboznámenie detí s témou a predstavenie pojmu náhoda.

Vysvetlenie, že náhody existujú dva druhy – v tomto bode sme sa detí pýtali na to, aké procesy môžu byť náhodné a od čoho náhodný jav závisí. Hovorili sme, že niektorú náhodu dokážeme určitými spôsobmi popísať a niektorú nie.

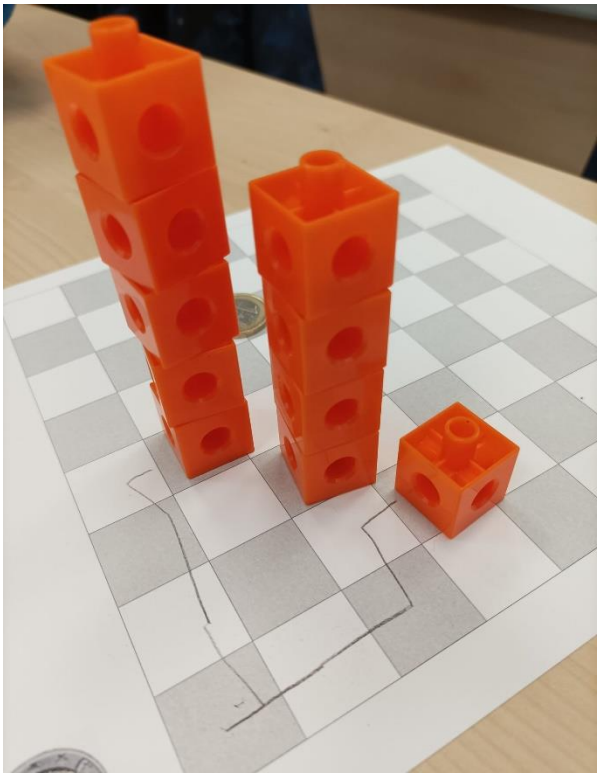
Predstavenie nosnej aktivity (hádzanie mincou) – v tomto bode sme deťom rozdali šachovnicu, na ktorej sa pohybovali kockami vpravo alebo dolu podľa toho, čo im padlo na minci. Na každú kocku mali 4 hody mincou, a teda z každou kockou zastali na jednom z piatich políčok šachovnice. Každá dvojica mala 10 kociek.

Význam políčok šachovnice – v tomto bode sme deťom predstavili, že každé políčko šachovnice predstavuje jedno povolanie, ktoré je pre nich „súdené“, pretože na ňom zastali kockou.

Problém so zapisovaním cesty – v tomto bode dostali deti za úlohu zapisovať s,i akou cestou sa na konkrétne políčko šachovnice dostali bez toho, aby sme ich na konkrétny spôsob navádzali.

Dohodnutie spoločného značenia – v tomto bode nám deti povedali, akým spôsobom si cesty značili a dohodli sme sa na spoločnom značení.

Spojenie všetkých výsledkov a vysvetlenie spoločného výsledku – v tomto bode sme spojili všetky výsledky a vznikol nám histogram binomického rozdelenia pravdepodobnosti. Následne sme si hádzanie mincou nasimulovali v Exceli a spoločne sme si vytvorili program v prostredí Scratch, ktorý taktiež simuloval výsledky hodu mincou pre zadaný počet hodov.



Obr. 1 Výsledok náhodného pokusu hádzania mincou

1.2 Neorganizovateľná náhoda

Predstavenie problémovej úlohy – v tomto bode sme sa detí spýtali ako by sa mali obliecť, keby idú na výlet na nimi vybraté miesto, keď majú k dispozícií predpovede počasia za dobu jedného týždňa, z každého dňa majú 8-dňovú predpoveď.

Skúmanie predpovedí – v tomto bode sme skúmali predpovede z jednotlivých dní a hľadali sme, či bola predpoveď v presná, bola v určitom intervale alebo nebola presná vzhľadom na reálnu teplotu v čase konania krúžku a spoločne sme výsledky porovnávali.

Zhodnotenie situácie – v tomto bode sme viedli diskusiu na to ako sa obliecť keby ideme na výlet na deťmi zvolené miesta. Cieľom bolo pracovať s variabilitou náhodných javov. Súčasne sme chceli ukázať, že čím viac sa blíži deň, na ktorý je predpoveď počasia, tým je interval spoľahlivosti predpovede užší, tým menší rozptyl má predpoveď.

2 Informatické krúžky zamerané na informatické myslenie s matematikou

Informatických krúžkov zameraných na informatické myslenie s matematikou bolo šesť. Boli zamerané na prácu so zariadením BBC micro:bit a na využitie jeho jednotlivých funkcií.

2.1 Zoznámenie so zariadením BBC micro:bit a kódovanie obrázka

Prvý krúžok s BBC mico:bitom bol zameraný na abstrakciu a algoritmizáciu (informatické myslenie) a na porozumenie a využitie súradnicovej sústavy v rovine (matematika).

Predstavenie zariadenia BBC micro:bit – v tomto bode sme deťom rozdali zariadenia BBC micro:bit, vysvetlili im ich jednotlivé súčasti a spoločne sme si prešli základným tutoriálnym programom.

Zobrazovanie obrázkov – v tomto bode sme ukázali, ako sa na obrazovke zobrazujú obrázky. Deti dostali za úlohu zvolený obrázok zobraziť.

Kódovanie obrázkov – deti dostali obrázky zakódované pomocou binárneho kódu. Ich úlohou bolo daný obrázok zobraziť na obrazovku. Ďalšou úlohou bolo vybrať si obrázok a zakódovať ho do binárneho kódu.

2.2 Krokomer

Tento krúžok bol zameraný na rozvoj abstrakcie, algoritmizácie, schopnosti odstraňovať chyby a automatizáciu, z matematického hľadiska na rozvoj štatistického myslenia a schopnosť identifikovať zdroje variability a chyby v meraní.

Počítadlo ľudí – v tomto bode mali deti za úlohy naprogramovať zariadenie BBC micro:bit ako počítadlo ľudí vchádzajúcich do alebo vychádzajúcich z miestnosti.

Krokomer – v tomto bode mali deti za úlohu naprogramovať zariadenie BBC micro:bit, aby fungovalo ako krokomer. Úlohou bolo aj zariadenie otestovať prejdením zadanej vzdialenosti a potom porovnať počet krkov narátaných zariadením a narátaných žiakmi.

Zdroje variability – v tomto bode sme s deťmi diskutovali o tom, čo môže ovplyvňovať počet krokov až sme sa dostali k otázke prečo BBC micro:bit zaznamenal asi polovicu krokov oproti tomu, čo napočítali žiaci.

Opravenie kódu – v tomto bode mali deti za úlohu opraviť kód tak, aby rátal kroky za obe nohy (odpoveď na otázku z predchádzajúceho bodu).



Obr. 2 Krokomer

2.3 Kameň, papier, nožnice

Tento krúžok bol zameraný automatizáciu a algoritmizáciu a v matematike na rozvoj štatistického myslenia, na zber údajov a prácu s nimi.

Kameň, papier, nožnice – v tomto bode bolo úlohou žiakov naprogramovať zariadenie BBC micro:bit tak, aby simulovalo hru kameň, papier, nožnice. Následne si mali medzi sebou zahrať s rôznymi deťmi 5 hier a zapamätať si s kým hrali, čo komu padlo a kto vyhral.

Pomocná tabuľka – v tomto kroku mali deti znova zahrať 5 hier, ale mohli si veci zapísať na papier do pripravenej tabuľky.

Abstrakcia – v tomto bode sme diskutovali o tom, či je pre nás dôležité zapamätať si všetky údaje ktoré sme sa snažili si zapamätať. Dospeli sme k tomu, že dôležitým údajom je pre nás počet výhier.

Externá pamäť – v tomto bode mali deti preprogramovať zariadenie BBC micro:bit tak aby im

stále simulovalo hru kameň, papier, nožnice pri potrasení a aby pri výhre si zaznamenali počet výhier tlačidlom A, počet hier tlačidlom B a pomocou stlačenia A+B si vedeli zobraziť oba údaje. Následne si znova zahrali niekoľko hier.

2.4 Uzavretie obvodu

Tento krúžok bol zameraný v IM – algoritmizácia a bol predpríprava na krúžok 5.

Uzavretie a otvorenie okruhu – v tomto bode sme deťom vysvetlili ako funguje elektrický obvod na vypnutie a zapnutie svetla. Následne mali za úlohu naprogramovať zariadenie BBC micro:bit tak aby sa pri uzavretí obvodu pomocou krokosvoriek na displeji zobrazil obrázok.

Vodivosť - vysvetlili sme si prečo prúd prechádza cez krokosvorky a následne ukázali, že prepájať sa dá aj vlastným telom, prstom. Následne deti skúšali vytvoriť

ľudskú reťaz a takýmto spôsobom uzavrieť okruh aby sa zobrazil obrázok.

Alobalový klavír – v tomto bode mali deti za úlohu vytvoriť klavír pripojením kúskov alobalu na krokosvorky. Pri dotyku prstu s alobalom BBC micro:bit zahral tón zvolenej frekvencie. Úlohou bolo vytvoriť klavír pre jeden tón, potom dva a nakoniec pre tri.

Mrkvový klavír – v tomto bode si deti vyskúšali, že alobal alebo ľudské telo nie sú jediné vodivé veci. Kúsky alobalu nahradili mrkvami a tým si vytvorili „mrkvový klavír“.

2.5 Hudba

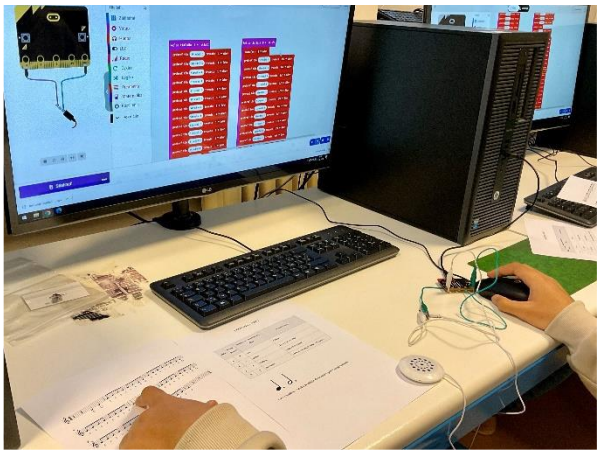
Tento krúžok bol zameraný na algoritmizáciu a automatizáciu a prácu so zlomkami.

Zahranie melódie – v tomto bode mali deti za úlohu naprogramovať zariadenie BBC micro:bit tak, aby cez pridaný reproduktor zahral deťmi zvolenú melódiu.

Notová osnova – v tomto bode sme deťom rozdali notový zápis a ich úlohou bolo naprogramovať noty do zariadenia BBC micro:bit bez ohľadu na dĺžku jednotlivých nôt, nechať si melódiu zahrať a skúsiť uhádnuť, o akú pieseň ide.

Dĺžka nôt – v tomto kroku sme deťom rozdali legendu nôt a mali do programu pridať duplikovanú verziu pôvodnej melódie a upraviť ju tak, aby brali ohľad na dĺžku nôt a pauzy.

Skrytá matematika – v tomto bode sme si ukázali, že v každom takte (časť na notovej osnovy vymedzená dvoma zvislými čiarami) sa musí súčet dĺžok nôt rovnať číslu, určenému ako dĺžka taktu.



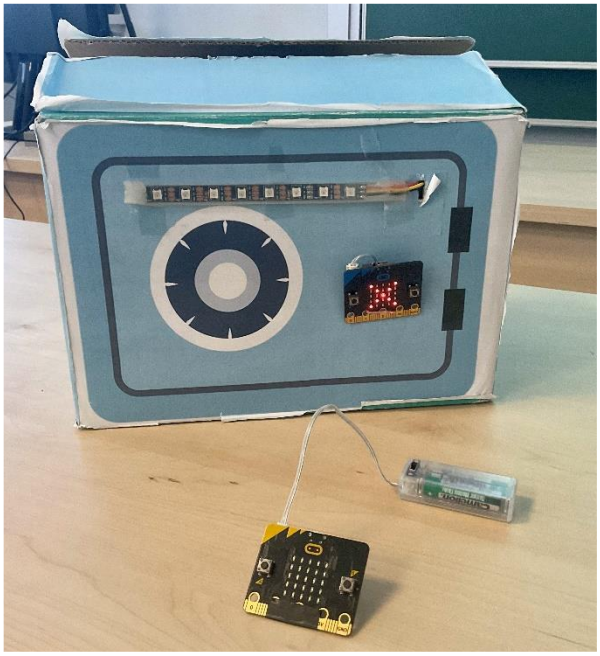
Obr. 3 Hudba - kód

2.6 Trezor

Tento krúžok bol zameraný v na paralelizmus a abstrakciu a využíval kombinatorické myslenie žiakov.

Posielanie správ – v tomto bode sme deti rozdelili do dvojíc a priradili im číslo skupiny. Ich úlohou bolo naprogramovať zariadenie BBC micro:bit tak, aby posielali správy (iná pri stlačení tlačidla A a iná pri stlačení tlačidla B) svojej dvojičke a na základe prijatej správy sa zmenil dvojičke obrázok na obrazovke.

Odomknutie trezora – v tomto bode bolo úlohou žiakov zistiť, na akej frekvencii (0 – 255) prijíma BBC micro:bit v trezore signál a odomknúť trezor. Úloha bola skupinová, no nenavádzali sme ich na to, aby sa zorganizovali a čísla si rozdelili. Mali na to prísť sami.



Obr. 4 Trezor

Záver

V článku uvádzame spolu osem aktivít vhodných pre voľnočasovú činnosť žiakov nižšieho sekundárneho vzdelávania. Ďalším cieľom bude zhodnotiť prínos týchto aktivít a kvantifikovať ich vplyv na úroveň informatického myslenia žiakov.

Podarilo sa nám úspešne identifikovať oblasti rozvoja informatického a matematického myslenia prostredníctvom týchto aktivít, viac informácií môžete nájsť v článku [13].

Poďakovanie

Chcel by som poďakovať svojej školiteľke doc. PaedDr. Janke Medovej, PhD. za jej vedenie, vedomostnú podporu a pomoc pri realizácii krúžkov. Taktiež by som sa chcel poďakovať Mgr. Martinovi Cápayovi, PhD. za jeho pomoc a vedenie pri tvorbe programu na krúžky a taktiež pomoc pri realizácii krúžkov.

Práca vznikla v rámci riešenia projektu APVV-20-0599 APVV Intervenčný program v prírodných vedách a matematike.

Použitá literatúra

[1] WING, Jeannette M. 2011. Research Notebook: Computational Thinking-What and Why?, The Link, The magazine of the Carnegie Mellon University School of Computer Science. Pittsburgh

[2] WING, Jeannette M. 2006. Computational Thinking in Communications of the ACM, Volume 49, Issue 3, s. 33-35. New York, doi: 10.1145/1118178.1118215

[3] CSIZMADIA, Andrew. a kol. 2015. Computational Thinking - A Guide for Teachers In Computing at school – Educate, engage, encourage, Part of BCS – The Chartered Institute for IT. Computing at School.

[4] BOCCONI, Stefania. a kol. 2016. Developing computational thinking in compulsory education – Implications for policy and practice, 3. Understanding Computational Thinking, s. 15-23. Seville. doi: 10.2791/792158 ISBN 978-92-79-64442-9

[5] LEE, Irene. a kol. 2011. Computational thinking for youth in practice In ACM Inroads Volume 2, Issue 1 in March 2011. New York, https://doi.org/10.1145/1929887.1929902

[6] ADDO, Edward, Kamil YAGCI. Automation, Encyclopedia of Tourism. Hong Kong. 2016. doi: 10.1007/978-3-319-01384-8 ISBN 978-3-319-01385-5

[7] RICH, Peter J. a kol. 2019. Framework for Decomposition in Computational Thinking In ITiCSE '19: Proceedings of the 2019 ACM Conference on Innovation and Technology in Computer Science Education, júl 2019, s. 416-421. Aberdeen. 2019. https://doi.org/10.1145/3304221.3319793 ISBN 978-1-4503-6895-7

[8] WONG, Gary K.W. – JIANG, Shan. 2018. Computational Thinking Education for Children: Algorithmic Thinking and Debugging. Wollongong In IEEE International Conference on Teaching, Assessment and Learning for Engineering (TALE), 4.-7. Decembra vo Wollongong, s. 328-334. Wollongong. doi: 10.1109/TALE.2018.8615232 ISBN 978-1-5386-6523-7

[9] DOUGHERTY, Barbara. a kol. 2014. Developing Concepts and Generalizations to Build Algebraic Thinking: The Reversibility, Flexibility, and Generalization Approach, Volume: 50 issue: 5, 19. Decembra 2014, s. 273-281. https://doi.org/10.1177/1053451214560892

[10] Sneider, C. a kol. 2014. Computational Thinking in High School Science Classrooms. The Science Teacher, 081. https://doi.org/10.2505/4/tst14_081_05_53

[11] Chiesi, F., Primi, C., & Morsanyi, K. (2011). Developmental changes in probabilistic reasoning: The role of cognitive capacity, instructions, thinking styles, and relevant knowledge. Thinking & Reasoning, 17(3), 315-350. https://doi.org/10.1080/13546783.2011.598401

[12] Bryant, P., & Nunes, T. (2012). Children's understanding of probability A literature review (full report). Nuffield Foundation.

[13] Fojtík, M., Cápay, M., Medová, J., & Valovičová, Ľ. (2023). Activities with BBC micro: bit as a Foundation for Statistical Reasoning of Lower-Secondary Students. Mathematics, 11(14), 3206.

Stanovení těkavých látek ve víně – Nástrahy kvantitativní analýzy při využití mikroextrakce na tuhou fázi

Wine Volatile Compounds Asessment – Pitfalls of Quantitative Analysis using Solid Phase Microextraction

Michal Gross[1]
Školitel: Eva Vítová[1]
[1]Ústav chemie potravin a biotechnologií, FCH VUT, Purkyňova 112, 612 00 Brno
michal.gross@vut.cz, vitova@fch.vut.cz

Abstrakt

Práce se zabývá využitím techniky mikroextrakce na tuhou fázi při kvantitativní analýze vybraných těkavých látek v révových vínech.

První část ukazuje na možnost zvýšení účinnosti mikroextrakce, kdy i jen malý zásah do vzorku skrze jeho zasolení před měřením má velmi významný dopad na získaná data (nárůst signálu o 350 %). Jako optimální byl zjištěn přídavek 1,0 g NaCl do 3 ml vzorku.

Druhá část představuje ukázku jisté obtížnosti správné kvantifikace při využití této techniky, pokud je zanedbán matricový efekt vzorku a běžné kalibrační techniky vedou k těžko přijatelným odchylkám (až 47 %), a nabízí řešení korekcemi skrze empiricky stanovené funkce kompenzující rozdíly ve složení.

Klíčová slova: SPME, těkavé látky, kalibrace.

Abstract

This paper deals with the use of the solid phase microextraction technique in the quantitative analysis of selected volatile compounds in grapevine wines.

The first part shows the possibility of increasing the efficiency of microextraction, where even a small intervention in the sample by salting it before measurement has a very significant impact on the data obtained (signal increase of 350 %). The addition of 1.0 g NaCl to 3 ml of sample was found to be optimal.

The second part demonstrates the certain difficulty of correct quantification using this technique when the matrix effect of the sample is neglected and conventional calibration techniques lead to hardly acceptable deviations (up to 47 %), and offers a solution by corrections through empirically determined functions compensating differences in composition.

Key Words: SPME, volatile compounds, calibration.

Úvod

Analýza potravin dnes zaujímá nezastupitelnou roli při kontrole kvality a bezpečnosti potravin, ať už jde o potvrzení nutriční hodnoty produktu, a tedy i správné výrobní praxe a použití kvalitních surovin (obsah vitaminů, esenc. mastných kyselin, čistých svalových bílkovin apod.), jeho zdravotní nezávadnosti (mikrobiální čistota, nepřítomnost toxinů) nebo ověření původu či zvláštní kvality výrobků s vyšší přidanou hodnotou (typicky extra panenský olivový olej původem např. v Itálii). Vzhledem k tomu, že se spotřebitelé v dnešní době více a více zajímají o původ potravin a způsob jejich produkce (často s odkazem na udržitelnost a ekologii), je třeba vyvíjet a zavádět nové metody kontroly kvality potravin schopné odhalit (nebo alespoň důvodně upozornit na) jakkoli falšované produkty. Vývoj technik pro autentizaci potravin se proto řadí mezi aktuální problematiky food science [1].

V oblasti kontroly a autentizace vín lze problematiku rozdělit na dva okruhy – odhalování nepovolených výrobních praktik (přídavky cukru, glycerolu, kyselin, používání zakázaných agens v technologii apod.) a de facto dodržování správného značení, tedy kontrola původu a „náplně lahve“ – víno z uvedené odrůd(y) – a příp. speciálních postupů při produkci (např. u šumivých vín). Druhá oblast kontroly si na rozdíl od první nevystačí s analýzou jednoho či několika málo parametrů, nýbrž jich vyžaduje větší množství a následné zpracování dat pokročilejšími statistickými metodami. Tento tzv. fingerprinting typicky vyžaduje analýzu velkého počtu spolehlivě autentických vzorků pomocí více technik (separační techniky, prvková či izotopová analýza), nalezení společného „vzorce“ a následné ověření a validace modelu na dalších vzorcích, vyhovujících i nevyhovujících [2].

Autentizace vína z pohledu vstupní suroviny, tj. hroznu dané odrůdy (jedné či více), se opírá

především o metabolomické analýzy – charakterizace obsahu těkavých a fenolických látek, peptidů aj. Pro stanovení těkavých látek se nabízí poměrně široká řada extrakčních metod, navzájem se lišící v náročnosti, časové i manuální, nákladnosti i bezpečnosti. Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) mezi nimi vyniká jednak možností prakticky plné automatizace, jednak absencí jakýchkoli rozpouštědel a nakonec i výrazně nižšími náklady na jednu analýzu, započítají-li náklady za čas (mzdy) a na činidla konvenčních extrakcí. Technika SPME přitom nijak nezaostává v parametrech jako jsou citlivost, opakovatelnost apod., prakticky jediná potíž nastává při správné a přesné kvantitativní analýze. A tento problém bohužel není ani v nejmenším zanedbatelný – nesprávné kalibrační modely mohou poskytovat i řádově odchýlené hodnoty.

SPME je na rozdíl od tradičních extrakčních postupů, jako jsou extrakce kapalina-kapalina (LLE), Soxhletova extrakce či extrakce na tuhou fázi (SPE), „nevyčerpávající" technikou, ze vzorku je odejmuta jen malá část analytů. Základním principem je sorpce analytů ze vzorku na vybraným polymerem potažené křemíkové vlákno za kontrolované teploty po přesně stanovený čas a jejich následná termická desorpce. SPME může být realizována ve dvou uspořádáních: přímá extrakce, při níž je vlákno zasunuto ve vzorku, a head-space extrakce, kdy dochází k sorpci analytů ze vzorku z prostoru plynné fáze nad ním (používanější varianta i pro menší opotřebování vlákna každou extrakcí) [3]. K teoretické extrahovatelné kvantitě se lze dopočítat pomocí rovnice (1), kde n je extrahované látkové množství, K_{fs} a K_{hs} jsou distribuční koeficienty mezi SPME vláknem a vzorkem, resp. mezi vzorkem a plynnou fází kolem něj (head space, HS), V_f, V_s a V_h jsou objemy sorpční vrstvy vlákna, vzorku a head space a C_0 je koncentrace analytu ve vzorku.

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \qquad (1), [3]$$

Z rovnice (1) vyplývá zřejmá závislost SPME na teplotě a času. Doba extrakce by měla být optimalizována, aby se celá soustava nacházela v rovnovážném stavu. V případě teploty proti sobě stojí tři jevy, na které má teplota protichůdný efekt: difúze látek ve vzorku dle Fickova zákona, podporovaná zvýšenou teplotou, a spolu s ní snažší přestup látek z matrice vzorku do head space a proti nim sorpce látek na polymer, která naopak probíhá lépe při nižší teplotě. Jedno nastavení metod tedy v zásadě není přenositelné pro (optimální) měření různých matric.

Všechny tři nejběžnější kalibrační techniky, pomocí vnějšího standardu, pomocí vnitřního standardu a pomocí přídavku standardu, jsou při analýzách použitelné, mohou ale vykazovat nepřesnosti, pokud se nezohlední specifika SPME. Kalibrace pomocí vnějšího standardu vyžaduje velmi dobrou kopii matrice vzorku, což je v případě pevných vzorků často nepřekonatelná překážka. Využití techniky standardního přídavku může být omezeno nedostupností standardů kvantifikovaných látek, jinak ovšem jde o velmi přesný, i když manuálně poměrně náročný způsob kalibrace. Nejpřesnější a přesto poměrně jednoduchá je kalibrace pomocí izotopově značených vnitřních standardů, jejichž nedostupnost a nákladnost je ovšem mimořádná. Využití běžného vnitřního standardu nemá pro přesnou kvantifikaci velký prostor vzhledem k tomu, že dochází k sorpci mnoha různých látek nestejnou kinetikou [4].

Metodika

Pro stanovení těkavých látek byla použita technika head space mikroextrakce na tuhou fázi ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickou detekcí (HS-SPME-GC-MS). Instrumentace GC-MS v konfiguraci GC Trace™ 1310 a MS ISQ™ LT (ThermoFisher Sc. Inc.), automatizovaná SPME pomocí autosampleru TriPlus (ThermoFisher Sc. Inc.) s vláknem DVB/CAR/PDMS 50/30 (Supelco Inc.), SW Xcalibur 2.2 (ThermoFisher Sc. Inc.), knihovna MS spekter NIST, MS Excel 2016 (Microsoft Corp.).

Parametry SPME: inkubace a extrakce 10, resp. 30 min při 40 °C, desorpce 7 min při 250 °C.

Parametry GC: splitless time 7 min, split flow 5 ml/min, purge 10 ml/min, inlet 250 °C, nosný plyn He 4.4, 1,0 ml/min v režimu constant flow, teplotní program: 40 °C, 1 min; 2°C/min po 100 °C, 3 min; 5°C/min po 130 °C, 5 min; 5°C/min po 200 °C, 11 min, separace na koloně LN-WAX (30 x 0,25 x 0,5) (Chromservis).

Parametry MS: teplota transfer line a iontového zdroje 220 °C, ionizace EI při 70 eV, skenování v režimu full scan v rozsahu 40 – 320 amu.

Použité vzorky: modelové víno (12% roztok ethanolu v MiliQ vodě, 1,5 g/l jablečné, vinné a mléčné kyseliny, 4,0 g/l glycerolu, 1,0 g/l 2,3-butandiolu, korekce pH na hodnotu 3,5 pomocí 2M KOH) a vzorek reálného vína (Ryzlink vlašský, r. 2021, suché, 11 % alk., vinařská podoblast Mikulovská). Měření 3 ml vzorku v 10ml vialkách se šroubovacími uzávěry s PTFE septy.

Schema experimentu zvýšení účinnosti SPME: Do serie vialek byly odměřeny rozdílné přídavky NaCl (0,0 – 2,0 g, viz dále), pipetováno 3 ml modelového vína s obsahem 0,1 mg/l vybraných těkavých látek a interní standard 2-heptanol pro kontrolu konzistentního průběhu chromatografie. Provedeno trojmo.

Schema experimentu kalibrace: Vzorek reálného vína byl rozdělen na tři podíly, jeden byl ponechán jako kontrola (11 % alk.), ve zbylých byl zvýšen obsah ethanolu na 12 a 13,5 % (var. a, b, c). U každého podílu byl proveden přídavek standardů vybraných těkavých látek (0, 150 a 300 µg/l) (var. 1, 2, 3) a následně zjištěn skutečný obsah těchto látek v použitém víně (jako průměr c_n stanovení při 11, 12 a 13,5 % alk., c_a, resp. c_b, c_c). Měření provedeno dvojmo. Vedle toho byla provedena kalibrace pomocí vnějšího standardu (tytéž látky v prostředí modelového vína, tj. 12 % alk.), která byla následně použita pro kvantifikaci všech vzorků (bez a s přídavky standardů). Hodnoty koncentrací látek získané pomocí vnější kalibrace (c_{a1}, c_{a2}, ... , c_{c3}) byly použity pro výpočet správnosti stanovení (r_{ij}), kde referencí byly hodnoty určené metodou přídavku standardu, viz rovnice (2). Dále byly spočteny průměry správností (r_i) a jejich relativní odchylky (Δr_i) z počtu analýz n, viz rovnice (3) a (4).

$$r_{ij} = \frac{c_{ij}}{c_n + c_{spike}} \qquad (2)$$

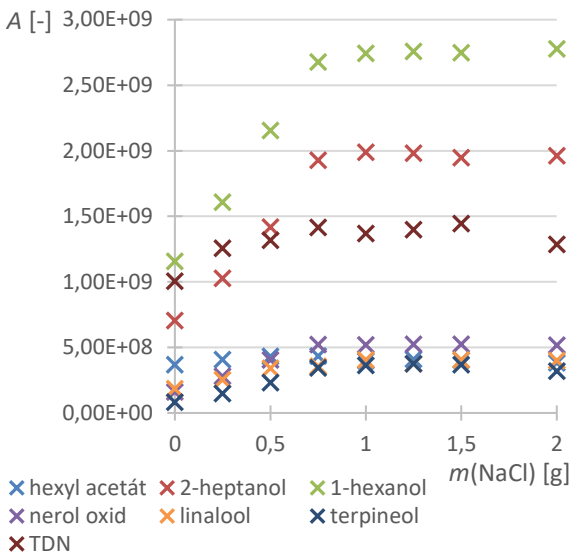
$$r_i = \frac{1}{n}\sum r_{ij} \qquad (3)$$

$$\Delta r_{i,rel} = \frac{1}{r_i}\sqrt{\frac{\sum (r_i - \bar{r}_i)^2}{n-1}} \qquad (4)$$

Výsledky a diskuse

V rámci práce byly provedeny dva experimenty: optimalizace přídavku NaCl s cílem zvýšení účinnosti HS-SPME a kvantitativní stanovení vybraných těkavých látek různými metodami kalibrace.

Do modelového vína s obsahem 0,1 mg/l vybraných standardů těkavých látek byly vloženy přídavky 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 a 2,0 g NaCl a byla sledována změna plochy píků jednotlivých analytů (total ion current signál MSD). Průměrné hodnoty zobrazuje Graf 1, z nějž je zřejmé, že dochází k nárůstu účinnosti do přídavku 1,0 g NaCl / 3 ml vzorku, kde se hodnoty ustálí, resp. nevykazují ani významný nárůst, ani pokles.



Graf 1 Závislost signálu (plochy píku) vybraných analytů na přídavku NaCl do vzorku (TDN - 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaftalen)

Tabulka 1 uvádí relativní odchylky naměřených ploch píků vybraných analytů. Jak je vidět, přídavek NaCl se propsal i do zlepšení opakovatelnosti, a to především u terpenoidů, z málo uspokojivých ca. 20% odchylek na stabilní hodnoty pod 10 %, kterých nabývá i u ostatních látek.

Tabulka 1 Relativní odchylky [%] stanovení vybraných analytů pro různé přídavky NaCl do vzorku

přídavek NaCl [g]	**0**	**0,25**	**0,5**	**0,75**	**1**	**1,25**	**1,5**	**2**
hex. acetát	5	1	6	5	10	8	9	10
2-heptanol	4	10	2	1	1	2	5	2
1-hexanol	3	5	4	3	1	0	0	0
nerol oxid	2	0	1	3	0	0	0	0
linalool	20	11	2	2	5	9	1	3
terpineol	19	12	1	0	3	4	7	7
TDN	17	17	16	6	8	5	2	5

V druhé části práce bylo provedeno srovnání kalibračních technik za účelem správné a přesné kvantifikace vybraných látek. Metodou přídavku standardu byla stanovena koncentrace 7 vybraných analytů, 2 alkoholů a 5 terpenoidů, které jsou považovány za odrůdové markery, hodnoty uvádí Tabulka 2.

Tabulka 2 Koncentrace analytů ve víně v µg/l (varianty pro různé obsahy ethanolu: 11 % c_a, 12 % c_b, 13,5 % c_c)

Analyt	c_a	c_b	c_c	c_n
E-hexenol	168,7	131,4	107,1	134,7 ± 31,0
Z-hexenol	14,7	11,7	11,0	12,4 ± 2,0
linalool	20,2	14,2	20,5	18,3 ± 3,6
α-terpineol	41,5	44,6	42,0	42,7 ± 1,6
γ-terpineol	4,4	2,2	3,3	3,3 ± 1,1
citronellol	2,9	1,1	1,4	1,8 ± 0,9
geraniol	14,1	8,9	16,8	13,2 ± 4,0

Pro analyty z Tabulky 2 byly dále připraveny kalibrační závislosti metodou vnějšího standardu (na střední hodnotě 12,0 % alkoholu), pomocí nichž byly stanoveny odpovídající koncentrace analytů v každé z devíti variant vzorku vína (c_{a1}, c_{a2}, ... , c_{c3}) a tyto následně vztaženy k očekávanému obsahu c_n. Průměry těchto správností stanovení spolu s jejich odchylkami uvádí Tabulka 3.

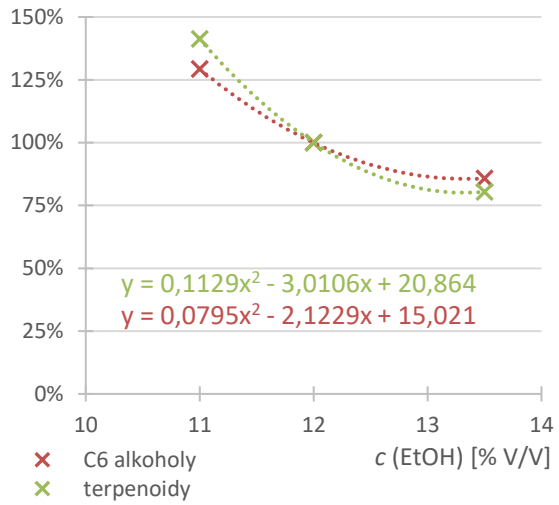
Tabulka 3 Správnosti stanovení analytů v různých matricích

Analyt	r_a	Δr_a	r_b	Δr_b	r_c	Δr_c
E-hexenol	123 %	7 %	100 %	0 %	87 %	2 %
Z-hexenol	131 %	15 %	105 %	12 %	93 %	11 %
linalool	134 %	6 %	100 %	1 %	84 %	7 %
α-terpineol	142 %	2 %	100 %	1 %	82 %	3 %
γ-terpineol	142 %	5 %	101 %	2 %	83 %	4 %
citronellol	147 %	3 %	100 %	1 %	78 %	1 %
geraniol	146 %	3 %	99 %	3 %	80 %	3 %

Z dat v Tabulce 3 je patrné, že při použití kalibrace metodou vnějšího standardu dochází, podle očekávání, ke správné a přesné kvantifikaci u varianty vzorku, která je ve shodě s kalibrační matricí, tj. 12 % alkoholu. U varianty s nižším obsahem alkoholu (11 %) dochází k významnému nadhodnocení a analogicky k podhodnocení naměřených koncentrací u vzorků s jeho vyšším obsahem (13,5 %).

Odchýlení od správné hodnoty je poměrně konzistentní, u C6 alkoholů o 27 % (mezi sebou o 4,5 %) v případě nízkoalkoholové matrice a o 10 % (vzájemně o 4,7 %) u vysokoalkoholové, respektive u terpenoidů o 42 % (3,7 %) a 19 % (3,5 %).

Z hodnot relativních odchylek (Δr_i) v Tabulce 3 lze říct, že kvantifikace pomocí vnějšího standardu dává, vyjma *Z*-hexenolu, velmi přesné výsledky, potíž je ovšem s jejich správností, zejména u terpenoidů (speciálně v případě nižší koncentrace ethanolu v matrici) je odchylka nepřijatelná. Pozitivní ovšem je, že se vychýlení hodnot v rámci skupiny chemicky příbuzných látek liší jen velmi málo (pod 5 %), tudíž je možné hledat funkci odchylky na obsahu ethanolu ve vzorku. Prosté proložení správností stanovení kvadatickými funkcemi, jak je zobrazuje Graf 2, poskytuje jednoduchý model pro korekce výsledků při používání kalibrace metodou vnějšího standardu při měření reálných vzorků vín, jejichž obsah ethanolu v drtivé většině spadá do intervalu 11,0 – 13,5 %.



Graf 2 Závislost správnosti kvantifikace skupin analytů metodou vnějšího standardu při použití kalibrační matrice s 12,0 % ethanolu

Závěr

Předmětem této malé studie bylo poukázat na některé podstatné aspekty správné praxe s technikou SPME.

První z experimentů ukazuje na výhodnost optimalizace podoby vzorku k analýze. I když HS-SPME teoreticky nevyžaduje jakoukoli předúpravu vzorku, vhodná modifikace může pozitivně přispět k účinnosti extrakce, a v důsledku tak i citlivosti stanovení. Využití vysolovacího efektu má na extrakci těkavých látek z kapalných vzorků velmi pozitivní účinek. V provedeném experimentu vzrostl po přídavku 1,0 g NaCl signál vybraných analytů o 18 – 352 %, vedle toho navíc došlo ke zvýšení přesnosti, resp. opakovatelnosti stanovení.

Druhý experiment představuje problematiku správné kvantifikace těkavých látek ve víně, tj. roztoku s variabilním složením co se dvou základních složek týče. Rozdíl pouhého 1 % obsahu ethanolu ve víně velmi významně zkresluje získané výsledky (až o 47 %), pokud je pro kvantifikaci využita pouze metoda vnějšího standardu. Vzhledem k manuální, časové a konečně i finanční náročnosti analýzy s využitím kalibrace metodou přídavku standardu je nalezení

způsobu korekce matricového efektu způsobeného ethanolem více než žádoucí. Tato práce navrhuje zavedení empirických funkcí ukazujících odchýlení pro určité skupiny látek při použití stálé matrice pro kalibraci pomocí vnějšího standardu. Představenou alternativu řešení je ale nezbytné validovat dalšími měřeními, a to jak na škále obsahu alkoholu ve vzorku, obsahů těkavých látek, skupin analytů a konečně i na dalších reálných vzorcích vín.

Poděkování

Příspěvek je součástí práce podporované Standardním projektem specifického výzkumu No. FCH-S-23-8330.

Použitá literatura

[1] KUDLEJOVA, Lucie – RISTICEVIC, Sanja. Application of Solid-Phase Microextraction in Food and Fragrance Analysis. In PAWLISZYN, Janusz Handbook of Solid Phase Microextraction. London: Elsevier, 2012, s. 290-334. ISBN: 978-0-12-416017.

[2] WATERHOUSE – Andrew, SACKS – Gavin, JEFFERY – David. 2016. Understanding Wine Chemistry. Chichester: John Wiley & Sons, 443 s. ISBN 9781118627808.

[3] PAWLISZYN, Janusz. Theory of Solid-Phase Microextraction. In PAWLISZYN, Janusz Handbook of Solid Phase Microextraction. London: Elsevier, 2012, s. 290-334. ISBN: 978-0-12-416017.

[4] OUYANG – Gangfeng. Calibration. In PAWLISZYN, Janusz Handbook of Solid Phase Microextraction. London: Elsevier, 2012, s. 290-334. ISBN: 978-0-12-416017.

Inváz ne a expanzívne dreviny a ich vplyv na vegetáciu a pôdu (projekt IMPAWOS): charakteristika vybraných druhov a lokalít

Invasive and expansive woody species and their impact on vegetation and soil (IMPAWOS project): characteristics of selected species and locations

Lujza Kubáčková[1,2]
Školiteľ: Róbert Kanka[3]
[1]Katedra ekológie a environmentalistiky, FPVaI UKF, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,
[2,3] Ústav krajinnej ekológie, v.v.i., Slovenská akadémia vied, Štefánikova 3, 814 99, Bratislava
[1,2] lujza.kubackova@ukf.sk, [3]robert.kanka@savba.sk

Abstrakt
Inváz ne druhy rastlín výrazne znižujú druhové bohatstvo a biodiverzitu invadovaných ekosystémov a majú negatívny vplyv aj na ľudské zdravie a ekonomiku [1, 2]. Pôda, dostupnosť živín a ďalšie faktory ovplyvňujú šírenie inváznych druhov, ktoré spätne menia zloženie pôdy a procesy v nej prebiehajúce. Napriek výraznému vplyvu pôdy na inváz ne procesy neexistuje dostatok komplexného výskumu, ktorý by skúmal účinky inváznych rastlín súčasne na pôdu a vegetáciu [3, 4]. Rovnako je doteraz nedostatočná pozornosť venovaná pôvodným druhom rastlín schopným expanzívneho rozšírenia. Nedávny výskum porovnávajúci bylinné inváz ne a expanzívne druhy však naznačuje, že obe skupiny rastlín môžu mať podobne negatívne vplyvy na ekosystém [3]. Nadväzujúci projekt IMPAWOS, zameraný na porovnanie vplyvu inváznych a expanzívnych drevín na vegetáciu a pôdu, má za cieľ s využitím podobných metodických postupov prispieť k hlbšiemu pochopeniu tejto problematiky. V predkladanej práci sú zosumarizované výsledky prvej fázy projektu IMPAWOS, konkrétne charakteristika vybraných druhov a výskumných lokalít.
Kľúčové slová: inváz ne druhy, expanzívne druhy, dreviny, funkčné charakteristiky

Abstract
Invasive plant species significantly reduce species richness and biodiversity of invaded ecosystems and have a negative impact on human health and the economy [1, 2]. The soil, the availability of nutrients and other factors affect the spread of invasive species, which in turn change the composition of soil and the processes taking place in it. Despite the significant influence of soil on invasive processes, there is not enough comprehensive research investigating the effects of invasive plants simultaneously on soil and vegetation [3, 4]. In the same way, insufficient attention has been paid to native plant species capable of expansive spread. However, recent research comparing invasive and expansive herbaceous species suggests both groups of plants may have similar negative impacts on the ecosystem [3]. The subsequent IMPAWOS project, aimed at comparing the impact of invasive and expansive woody plants on vegetation and soil, aims to contribute to a deeper understanding of this issue using similar methodological procedures. The presented work summarizes the results of the first phase of the IMPAWOS project, specifically the characteristics of selected species and research locations.
Key Words: invasive species, expansive species, woody species, functional characteristics

Úvod

Rastlinné druhy sa z hľadiska pôvodnosti na určitom území delia na dve skupiny: pôvodné druhy, vyskytujúce sa na danom území prirodzene (v dôsledku evolučných procesov alebo prirodzeného rozšírenia do územia bez prispenia človeka); a druhy nepôvodné, nachádzajúce sa v dôsledku ľudskej činnosti mimo svojho prirodzeného areálu výskytu. Introdukcia nepôvodných druhov môže byť úmyselná (napr. výsadba vetrolamov/živých plotov) alebo neúmyselná (napr. kontaminanty tovaru, „čierni pasažieri“ pri doprave) [5, 6]. Podľa obdobia introdukcie rozlišujeme v rámci nepôvodných taxónov rastlín archeofyty, introdukované v období medzi začiatkom neolitického poľnohospodárstva a rokom 1500, a neofyty, introdukované po tomto časovom bode [7].

Nepôvodné druhy je možné klasifikovať aj z hľadiska inváznego procesu. Prechodne zavlečené druhy (casual species) sa vo voľnej prírode vyskytujú len dočasne, nie sú schopné vytvoriť reprodukujúce sa populácie a ich ďalší výskyt je závislý na opakovanom prísune diaspór ľudskou činnosťou. Naturalizované druhy (naturalized species) vytvárajú stabilné populácie schopné pretrvať mnoho životných cyklov a ich existencia v novom území už nie je závislá od ľudskej činnosti. Inváznе druhy (invasive species) sú také naturalizované nepôvodné druhy, ktoré sú schopné sa v krátkom čase rozšíriť na značnom území [5, 8].

Prehľad o nepôvodných rastlinných druhoch vyskytujúcich sa na území Slovenskej republiky je možné získať z práce "Inventory of the alien flora of Slovakia" [5], ktorá zahŕňa prvý kompletný zoznam nepôvodných cievnatých rastlín Slovenska. Zoznam obsahuje 916 taxónov, z ktorých je 3,3 % inváznych [9]. Informácie o ďalších nepôvodných rastlinných druhoch, ktoré sa na Slovensku novo vyskytli v nedávnej minulosti, ponúka práca Eliáš et al., 2023 [10]. Väčšina inváznych druhov je zaradená medzi byliny, medzi inváznymi druhmi Slovenska nájdeme len štyri dreviny: *Robinia pseudoacacia*, *Lycium barbarum*, *Ailanthus altissima*, *Acer negundo* [5]. Niekoľko ďalších druhov stromov a kríkov (*Padus serotina*, *Amorpha fruticosa*, *Acer saccharinum*, *Fraxinus pennsylvanica*, atď.) je klasifikovaných ako potenciálne inváznе druhy [11]. Hoci sú inváznе dreviny v porovnaní s bylinnými inváznymi druhmi v menšine a často prehliadané, je potrebné im z viacerých dôvodov venovať náležitú pozornosť. Po ich úspešnom rozšírení do väčších oblastí je ich eradikácia mimoriadne náročná a ich inváziе majú zásadné dopady na fungovanie ekosystémov [12]. Vďaka podrobným historickým údajom o dobe a rozsahu introdukcie dokumentovaných lesníckymi a záhradníckymi záznamami zároveň dreviny predstavujú ideálnu modelovú skupinu, ktorá môže pomôcť objasniť zásadné aspekty inváznej ekológie [13].

Inváznе druhy rastlín majú významný vplyv na ekosystémy, do ktorých prenikajú, sú schopné meniť zloženie pôdy a zastúpenie živín, druhové zloženie vegetácie invadovaného biotopu a znižovať biodiverzitu, pričom ich pôsobenie je komplexné a vzájomne prepojené. Vhodným príkladom ilustrujúcim tieto procesy je *Robinia pseudoacacia*, invázny neofyt ohrozujúci najmä suché a polosuché trávne porasty patriace k druhovo najbohatším a najohrozenejším typom biotopov, v ktorých vplyvom zmien vo svetelnom režime, mikroklíme a pôdnych podmienkach spôsobuje vyhynutie mnohých ohrozených rastlín a bezstavovcov [14]. Z nedávnej štúdie [15] zameranej na porovnanie porastov *Robinia pseudoacacia* s neinvadovanými porastmi v porovnateľných abiotických podmienkach vyplynulo, že podmienky v lokalitách s agátom boli vždy teplejšie a svetlejšie, s väčším množstvom dusíka a fosforu v pôde, čo spôsobilo výskyt heliofilnejších neofytov, archeofytov a tráv. Zmena podmienok stanovišťa na teplejšie a suchšie vplyvom rozšírenia druhu *Robinia pseudoacacia* do pôvodných porastov je nežiadúca nielen vzhľadom na prebiehajúce klimatické zmeny, ale aj z dôvodu vytvárania vhodných podmienok pre následné rozširovanie ďalších nepôvodných druhov [14, 15]. Podobne aj nedávny výskum zameraný na hodnotenie štruktúry lesných porastov nepôvodného druhu *Quercus rubra* (inváznу napr. v susednej Českej republike) ukazuje na zmenu rastlinných spoločenstiev, pokles druhového bohatstva, ako taktiež pokles výskytu vzácnych druhov v porovnaní s podobnými lokalitami s prirodzenou vegetáciou. Dôvodom môže byť hustý zápoj *Quercus rubra* a tiež množstvo a vlastnosti opadaných listov *Quercus rubra*, ktoré do veľkej miery bránia rastu bylinných druhov v podraste [16].

Expanzívne druhy rastlín môžu predstavovať podobnú hrozbou ako inváznе druhy. Expanzívne druhy sú v danom území pôvodné, avšak v dôsledku ľudskej činnosti (eutrofizácia, degradácia biotopov a pod.) rozširujú svoj areál na úkor iných druhov. Často sa vyskytujú v človekom zmenených biotopoch. Na Slovensku k takýmto druhom patrí napríklad *Sambucus nigra*, *Artemisia vulgris* alebo *Cirsium arvense* [3, 4, 11]. Vzhľadom na ich zaradenie k domácej flóre sú expanzívne druhy všeobecne často vnímané ako neškodné. Ukazuje sa však, že aj takéto druhy sú schopné ovplyvňovať tok energie a chemických látok, degradovať biotopy, v ktorých sa šíria, ako aj recipientnú vegetáciu, čím predstavujú riziko pre iné druhy [3, 4].

Vedci sa dosiaľ zameriavali prevažne na skúmanie vplyvov inváznych druhov rastlín, pričom expanzívnym druhom bola venovaná len okrajová pozornosť. Pergl a kol. (2023) [4] zamerali svoj výskum na porovnanie účinkov nepôvodných inváznych a domácich expanzívnych, najmä bylinných druhov, aj v súvislosti so vzťahmi medzi rastlinami a zmenami v pôde. V práci realizovanej v Českej republike porovnávali vplyv piatich vybraných domácich dominantných druhov (*Calamagrostis epigejos*, *Filipendula ulmaria*, *Phalaris arundinacea*, *Rubus idaeus*, *Urtica dioica*) a piatich nepôvodných inváznych druhov (*Impatiens*

glandulifera, *Lupinus polyphyllus*, *Telekia speciosa*, *Reynoutria sp*., *Solidago canadensis agg*.) na vlastnosti pôdy (fyzikálne vlastnosti, dostupnosť živín a biologická aktivita). Zaujímavým zistením bolo, že vplyv nepôvodných inváznych a pôvodných expanzívnych druhov na pôdu nemožno vysvetliť jednoducho pôvodom druhov ako faktorom. Invázne aj expanzívne dominantné rastliny sú schopné zmeniť rýchlosť rozkladu zmenou kvality opadu a dostupnosti živín, najmä anorganického dusíka. Nadväzujúci projekt IMPAWOS zameraný na dominantné druhy drevín má za cieľ prispieť k hlbšiemu pochopeniu tejto problematiky.

1 Metodika

Náš výskum realizujeme v rámci medzinárodného projektu IMPAWOS. Jedná sa o spoluprácu medzi českou (Botanický ústav AV ČR), poľskou (Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN a Uniwersytet Śląski w Katowiciach) a slovenskou stranou (Ústav krajinnej ekológie SAV). Hlavným cieľom je zhodnotenie vplyvov nepôvodných inváznych a domácich expanzívnych drevín v typických biotopoch mierneho pásma strednej Európy. Zámerom je porovnať rôzne typy vplyvov na rastlinné spoločenstvá (druhová diverzita a bohatstvo rastlín) a pôdu (kvalita opadu, svetelný režim porastov a zdravotný stav pôdy vyjadrený fyzikálnymi, chemickými a biologickými ukazovateľmi). Metodika našej práce je v súlade s metodikou projektu IMPAWOS, ktorá vychádza z postupov a metód využitých pri predchádzajúcom projekte zameranom na porovnanie bylinných druhov.

Metodika je rozdelená do viacerých rokov. Projekt sme začali realizovať v roku 2023, prvou fázou bol výber vhodných dominantných druhov a taktiež lokalít, na ktorých bude prebiehať výskum. Výber cieľových druhov sa uskutočnil na základe teoretických poznatkov o ich ekológii a distribúcii, skúseností z terénu a predbežného výberu vhodných porastov. Počas vyhľadávania cieľových druhov v teréne sme pracovali s kľúčmi na určovanie rastlín [17, 18]. Požiadavky na výskumné lokality zahŕňali prítomnosť cieľového druhu s pokryvnosťou vyššou než 30% a dominanciou v poraste minimálne 15 rokov na zaistenie kontinuity vplyvu, prostredie bez výrazného vplyvu antropogénnych disturbancií a spontánny vývoj pôdy a vegetácie. Vplyvy dominantných druhov budú hodnotené porovnaním s kontrolnými lokalitami reprezentujúcimi prirodzenú vegetáciu bez prítomnosti dominantných druhov v blízkosti výskumných lokalít (do cca 500 metrov kvôli porovnateľným abiotickým podmienkam). Jedna kontrolná lokalita môže slúžiť ako kontrola pre jednu až dve výskumné lokality. Pri výbere konkrétnych výskumných lokalít sme pracovali s programom JUICE [19], v ktorom sme na základe dostupných fytocenologických záznamov uskutočnili predbežný výber vhodných lokalít s vysokými pokryvnosťami cieľových druhov. Tieto sme následne overovali priamo v teréne. Pri charakteristike vybraných druhov sme vychádzali z prác Jurko (1990) [20], Medvecká a kol. (2012) [5] – inváznу status a geografický pôvod druhov a z databázy PLADIAS – rastová [21] a životná forma [22], životná stratégia [23], anatómia [24], vytrvalosť [24] a funkčný typ listov [25], stratégia šírenia [26] a výskyt v biotopoch [27]. Názvy vyšších rastlín sú v súlade s Checklistom [28]. Pri určovaní biotopov sme vychádzali z aktuálneho Katalógu biotopov Slovenska [29].

Vplyv na vegetáciu bude hodnotený pomocou fytocenologických záznamov, na každej lokalite budú založené štyri subploty o veľkosti 16 m^2 a bude zaznamenaná vegetačná skladba a pokryvnosť jednotlivých druhov (máj 2024). Dáta budú vyhodnotené v programoch Turbowin [30] a JUICE [19]. Fyzikálne vlastnosti pôdy (textúra, štruktúra, pórovitosť a pod.) budú stanovené len jedenkrát (marec 2024), okrem teploty (na povrchu a v dvoch rôznych hĺbkach v pôde) a vlhkosti pôdy, ktoré budú merané kontinuálne počas celého trvania projektu pomocou dataloggerov TMS-4 (inštalované na jeseň 2023). Na stanovenie chemických vlastností pôdy (pH, vodivosť, organická hmota a celkové množstvo živín) budú päťkrát (november 2023, marec, máj, júl, október 2024) odoberané vzorky pôdy zo všetkých lokalít a analyzované v Laboratóriu ekochémie a environmentálneho inžinierstva v Poľsku. Sezónna dostupnosť živín v pôde bude meraná v dvoch obdobiach (od marca do konca mája 2024 a od konca mája 2024 do konca júla 2024) pomocou (PRS)™ prób (Plant Root Simulator) a analyzovaná v laboratóriách Western Ag Innovations v Kanade. Budú odobrané aj vzorky listov (jeseň 2023) na stanovenie obsahu živín, lignínu, celulózy, enzymatickej aktivity a pod. Časť odobraných listov bude využitá aj na stanovenie rýchlosti dekompozície (začiatok dekompozičného experimentu na jeseň 2023).

2 Výsledky a diskusia

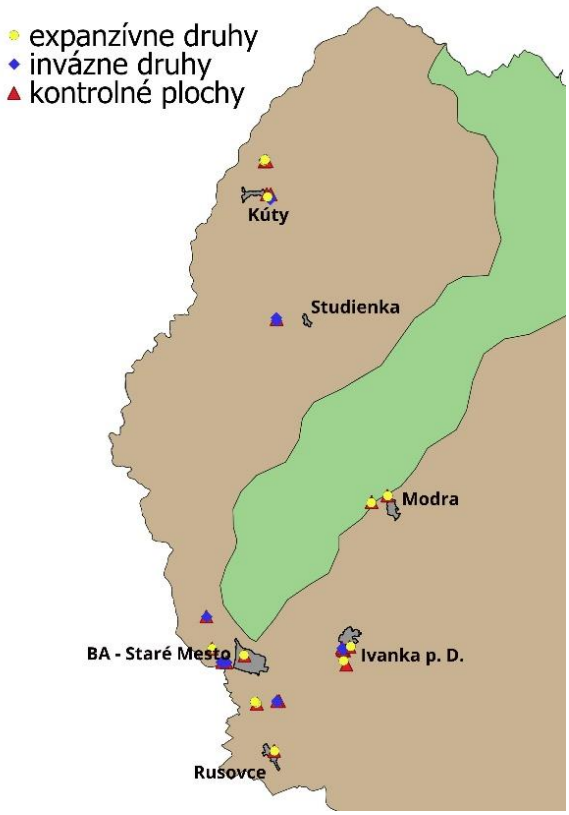
Aktuálne (marec 2024) je ukončená prvá fáza projektu. Sú definitívne vybrané cieľové dominantné (inváznе aj expanzívne) druhy, ako aj vhodné výskumné a k nim prislúchajúce kontrolné lokality. Na jeseň 2023 boli

podľa plánu odobraté vzorky listov, ktorých časť bola poslaná do laboratória v Poľsku na analýzy, a ďalšia časť bola využitá na dekompozičný experiment, ktorý aktuálne prebieha v teréne. Boli odobraté aj prvé vzorky pôd na stanovenie chemických parametrov, ktoré sa v súčasnosti taktiež analyzujú v laboratóriu v Poľsku.



Obr. 1 Umiestňovanie dekompozičných vrecúšok s filtračným papierom a s listami v porastoch *Robinia pseudoacacia* na výskumnej lokalite pri Kútoch.

Na základe podmienok stanovených v metodike sme založili celkovo 50 lokalít – 29 výskumných (z toho 15 lokalít s inváznymi a 14 s expanzívnymi druhmi) a 21 kontrolných (niektoré kontrolné lokality slúžia pre dve výskumné lokality). Všetky lokality sa z dôvodu časovej náročnosti a realizovateľnosti projektu nachádzajú na území západného Slovenska. Z fytogeografického hľadiska sa všetky lokality nachádzajú v rámci oblasti panónskej flóry (*Pannonicum*), v obvode eupanónskej xerotermnej flóry (*Eupannonicum*). Lokality pri meste Modra sa nachádzajú v hraničnej zóne s oblasťou západokarpatskej flóry (*Carpaticum occidentale*), obvodom predkarpatskej flóry (*Praecarpaticum*) [31].



Obr. 2 Poloha lokalít v rámci západného Slovenska. Zelená plocha = *Praecarpaticum*, hnedá plocha = *Eupannonicum.*
Zdroj: [31]

Zoznam dominantných druhov drevín vybraných v rámci projektu IMPAWOS sa nachádza v tabuľke 1. Pri každom druhu je uvedený jednak status (invázny/expanzívny) v rámci projektu IMPAWOS, ako aj status podľa Medvecká et al. (2012) [5]. Keďže projekt je medzinárodný a zoznamy inváznych druhov sú národného charakteru, v rámci skupiny „inváznych“ druhov skúmame aj druhy, ktoré u nás inváznu status nemajú. Keďže sa však správajú inváznе v niektorých susediacich krajinách a aj na Slovensku sú kategorizované ako naturalizované neofyty, považujeme ich zaradenie do našej práce za zaujímavé aj zo „slovenského“ pohľadu. To isté sa týka aj druhov skúmaných v rámci projektu ako „expanzívne“. Viaceré z týchto druhov sú využívané v prvkoch územných systémov ekologickej stability (napr. *Swida sanguinea*, *Prunus spinosa*) [32], preto považujeme za zmysluplné zamerať sa v rámci tohto projektu na ich vplyvy na okolitú vegetáciu a pôdu.

Druh	IMP	SR	Pôvod
Ailanthus altissima	inv	inv neo	Ázia
Fraxinus pennsylvanica	inv	nat neo	S Am
Quercus rubra	inv	nat neo	S Am
Robinia pseudoacacia	inv	inv neo	S Am
Negundo aceroides	inv	inv neo	S Am
Prunus cerasifera	inv	nat neo	E, Ázia
Padus serotina	inv	nat neo	S Am
Acer platanoides	exp	domáci	pôv
Fraxinus excelsior	exp	domáci	pôv
Quercus robur	exp	domáci	pôv
Populus tremula	exp	domáci	pôv
Tilia cordata	exp	domáci	pôv
Crataegus monogyna	exp	domáci	pôv
Prunus spinosa	exp	domáci	pôv
Swida sanguinea	exp	domáci	pôv

Tab. 1: Zoznam vybraných dominantných druhov. IMP = status v rámci projektu IMPAWOS, SR = status na území Slovenska, Pôvod = geografický pôvod taxónu, inv = invázny, nat = naturalizovaný, neo = neofyt, S Am = Severná Amerika, E = Európa, pôv = pôvodný.
Zdroj: [5]

V rámci charakteristiky našich vybraných dominantných druhov sme sa zamerali na niektoré z ich funkčných vlastností. Z hľadiska rastovej formy sa jedná prevažne o stromy, prípadne o kry, tomu zodpovedá aj životná forma – makrofanerofyt, resp. nanofanerofyt [21, 22]. Všetky druhy sa zhodujú v životnej stratégii, jedná sa o kompetítorov [23]. Taktiež niektoré funkčné charakteristiky listov sa medzi druhmi nelíšia; vytrvalosť listov je letná [24] a funkčný typ široké opadavé alebo poloopadavé [25]. Bližšiu charakteristiku vybraných druhov uvádzame v nasledujúcom texte, vychádzame zo zdrojov uvedených v metodike.

Ailanthus altissima je inváz ny neofyt pôvodom z Ázie s mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Epilobium* (prevažne anemochória a autochória). Je dominantou lesných kultúr nepôvodných listnatých drevín a optimum nachádza v krovinách a pionierskych lesíkoch lesných rúbanísk.

Fraxinus pennsylvanica je naturalizovaný neofyt pôvodom zo Severnej Ameriky s mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Epilobium* (prevažne anemochória a autochória). Je dominantou lesných kultúr nepôvodných listnatých drevín a optimum výskytu má v lužných lesoch.

Quercus rubra je naturalizovaný neofyt pôvodom zo Severnej Ameriky s mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Cornus* (prevažne autochória a endozoochória). Je dominantou lesných kultúr nepôvodných listnatých drevín a optimum má aj v acidofilných dúbravách a borovicových a smrekovcových kultúrach.



Obr. 3 Porast *Quercus rubra* na výskumnej lokalite pri Brodskom.

Robinia pseudoacacia je inváz ny neofyt pôvodom zo Severnej Ameriky s mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Allium* (prevažne autochória). Je konštantnou dominantou agátin, optimum má v krovinách a pionierskych lesíkoch lesných rúbanísk, v sutinových lesoch, teplomilných dúbravách a v lesných kultúrach nepôvodných listnatých drevín.

Negundo aceroides je inváz ny neofyt pôvodom zo Severnej Ameriky s mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Epilobium* (prevažne anemochória a autochória). Je dominantou lesných kultúr nepôvodných listnatých drevín a optimum výskytu má aj vo vŕbových krovinách hlinitých a piesčitých naplavenín, v krovinách a pionierskych lesíkoch lesných rúbanísk a v lužných lesoch.

Prunus cerasifera je naturalizovaný neofyt s pôvodom v Európe a Ázii s mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Cornus* (prevažne autochória a endozoochória). Dominantnou rastovou formou je strom, ale môže sa tiež vyskytovať ako ker. Optimum výskytu má vo vysokých mezofilných a xerofilných krovinách a tiež v krovinách a pionierskych lesíkoch lesných rúbanísk.

Padus serotina je naturalizovaný neofyt pôvodom zo Severnej Ameriky s mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Cornus* (prevažne autochória a endozoochória). Dominantnou rastovou formou je ker

a životnou formou nanofanerofyt, ale môže sa tiež vyskytovať ako strom a makrofanerofyt. Optimum výskytu má v dubohrabinách a acidofilných dúbravách.

Acer platanoides je domáci strom s mezomorfnou, príp. hygromorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Epilobium* (prevažne anemochória a autochória). Optimum výskytu preňho predstavujú lužné lesy, dubohrabiny, sutinové lesy, kvetnaté bučiny, vápnomilné bučiny a tiež lesné kultúry nepôvodných listnatých drevín.

Fraxinus excelsior je domáci strom s mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Epilobium* (prevažne anemochória a autochória). Je konštantnou dominantou lužných a sutinových lesov a optimum má aj vo vysokých mezofilných a xerofilných krovinách, jelšinách, dubohrabinách, kvetnatých a vápnomilných bučinách, bazofiných teplomilných dúbravách a taktiež v lesných kultúrach nepôvodných listnatých drevín.

Quercus robur je domáci strom s mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Cornus* (prevažne autochória a endozoochória). Konštantnou dominantou je v dubohrabinách, dominantou v lužných lesoch a acidofilných dúbravách, optimum dosahuje okrem vysokých mezofilných a xerofilných krovín aj v množstve lesných biotopov.

Populus tremula je domáci strom s mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Epilobium* (prevažne anemochória a autochória). Je dominantou krovín a pionierskych lesíkov lesných rúbanísk a optimum nachádza aj v lužných lesoch, dubohrabinách a acidofilných dúbravách.

Tilia cordata je domáci strom s mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Epilobium* (prevažne anemochória a autochória). Je konštantnou dominantou dubohrabín, dominantou sutinových lesov a optimum nachádza aj v lužných lesoch, vápnomilných bučinách, subkontinentálnych a acidofilných teplomilných dúbravách a v acidofilných dúbravách.

Crataegus monogyna je domáci druh, prevažne ker a z hľadiska životnej formy nanofanerofyt, ale môže sa vyskytovať aj ako strom a makrofanerofyt, so skleromorfnou, príp. mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Cornus* (prevažne autochória a endozoochória). Je dominantou vysokých mezofilných a xerofilných krovín a optimum výskytu nachádza na suchých trávnikoch skalných odkryvov a v teplomilnej vegetácii lesných lemov, v nízkych xerofilných krovinách, v dubohrabinách, sutinových lesoch a v bazofilných aj acidofilných teplomilných dúbravách.

Prunus spinosa je domáci ker so skleromorfnou, príp. mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Cornus* (prevažne autochória a endozoochória). Je konštantnou dominantou vysokých mezofilných a xerofilných krovín a dominantou nízkych xerofilných krovín. Optimum výskytu má v teplomilnej vegetácii lesných lemov, všetkých druhoch teplomilných dúbrav, v agátinách, a tiež v borovicových a smrekovcových kultúrach.

Swida sanguinea je domáci ker s mezomorfnou anatómiou listov, stratégiou šírenia je *Cornus* (prevažne autochória a endozoochória). Je dominantou vysokých mezofilných a xerofilných krovín a optimum výskytu má aj v teplomilnej vegetácii lesných lemov, nízkych xerofilných krovinách, lužných a sutinových lesoch, vápnomilných bučinách a v bazofilných a subkontinentálnych teplomilných dúbravách.

Keďže sa okrem samotných vybraných dominantných druhov zameriavame aj na okolitú vegetáciu, už v prvej fáze sme na základe našich pozorovaní v teréne a aktuálneho katalógu biotopov [29] predbežne stanovili biotopy, s ktorými budeme pracovať. Vzhľadom na to, že skúmanými druhmi sú stromy a v menšej miere aj kry, naše výskumné lokality sme zhodne s údajmi v literatúre zaradili prevažne do skupín LES Lesné biotopy a KRO Krovinové a kríčkové biotopy. V prípade inváznych neofytov *Ailanthus altissima*, *Quercus rubra* a *Robinia pseudoacacia* sme predbežne stanovili biotop XXO8 Porasty neofytných drevín zo skupiny XX Ruderálne biotopy. Presné zaradenie našich lokalít k jednotlivým biotopom uskutočníme na základe fytocenologických záznamov, ktoré budú predmetom našej ďalšej práce.

Záver

Prvá fáza projektu IMPAWOS prebehla podľa plánu, podarilo sa založiť 50 lokalít (29 výskumných a 21 kontrolných) nachádzajúcich sa na západnom Slovensku, prevažne v rámci fytogeografického obvodu *Eupannonicum*. Na lokalitách boli inštalované dataloggery TMS-4 kontinuálne snímajúce teplotu a vlhkosť, bol začatý dekompozičný experiment a odobraté prvé vzorky listov a pôdy na chemické analýzy. Zámery projektu boli naplnené aj ohľadom druhového zloženia dominánt. V rámci skupiny „inváznе druhy“ sú predmetom výskumu *Ailanthus altissima, Fraxinus pennsylvanica, Quercus rubra, Robinia pseudoacacia, Negundo aceroides, Prunus cerasifera* a *Padus serotina*, vo všetkých prípadoch sa jedná o neofyty, na Slovensku klasifikované ako inváznе (3 druhy), resp. naturalizované (4 druhy). V rámci skupiny „expanzívne druhy“ boli vybrané *Acer platanoides, Fraxinus excelsior, Quercus robur, Populus*

tremula, Tilia cordata, Crataegus monogyna, Prunus spinosa a *Swida sanguinea*. V prípade oboch skupín sa jedná o druhy s podobnými funkčnými charakteristikami, hlavne čo sa týka životnej stratégie (kompetítor), vytrvalosti listov (letná) a funkčného typu listov (široké opadavé alebo poloopadavé). Prevládajúca rastová forma je strom, resp. ker, v prípade životnej formy ide o marko- alebo nanofanerofyty. Najväčšie rozdiely sú v stratégii šírenia. Z hľadiska biotopov ide o druhy vyskytujúce sa hlavne v rámci lesných a krovinových biotopov, avšak častým je aj ruderálny biotop XX08 Porasty neofytných drevín. Presné určenie biotopov našich lokalít, ako aj ďalší výskum v rámci projektu IMPAWOS, bude predmetom našej nadväzujúcej práce.

Poďakovanie

Projekt bol podporený grantom "Weave-UNISONO" (The Czech Science Foundation (GAČR) & National Science Centre (NCN)), 2022/04/Y/NZ8/00057 a grantami VEGA 2/0048/22 a VEGA 2/0147/21.

Ďakujem môjmu školiteľovi RNDr. Róbertovi Kankovi, PhD. za cenné pripomienky a pomoc pri písaní práce.

Použitá literatúra

[1] HAUBROCK, Phillip J. et al. 2021. Economic costs of invasive alien species across Europe. In NeoBiota, vol. 67, pp. 153–190. ISSN 1314-2488.

[2] WITTLINGER, L. et al. 2022. Geographical distribution and spatio-temporal changes in the occurrence of invasive plant species in Slovak Republic. In Biosystems Diversity, vol. 30, no. 2, pp. 105–118. ISSN 2520-2529.

[3] HEJDA, Martin et al. 2021. Impact of invasive and native dominants on species richness and diversity of plant communities. In Preslia, vol. 93, pp. 181–201. ISSN 0032-7786.

[4] PERGL, Jan et al. 2023. Plant-soil interactions in the communities dominated by alien and native plants. In Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, vol. 59, pp. 1-12. ISSN: 1618-0437.

[5] MEDVECKÁ, Jana et al. 2012. Inventory of the alien flora of Slovakia. In Preslia, vol. 84, pp. 257–309. ISSN 0032-7786.

[6] GALVÁNEK, Dobromil et al. 2021. Návrh akčných plánov na riešenie problematiky prienikových ciest neúmyselnej introdukcie a neúmyselného šírenia inváznych nepôvodných druhov na území Slovenskej republiky a na území EÚ cez územie Slovenskej republiky. Bratislava: Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV. 59 s.

[7] PYŠEK, Petr et al. 2004. Alien plants in checklists and floras: towards better communication between taxonomists and ecologists. In Taxon, vol. 53, pp. 131–143. ISSN 0040-0262.

[8] RICHARDSON David M. et al. 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definition. In Diversity and Distributions, vol. 6, pp. 93–107. ISSN 1366-9516.

[9] MÁJEKOVÁ, Jana et al. 2021. Alien (invasive) vascular plants in Slovakia - a story of successful plant immigrants. In Environmental & Socio-Economic Studies, vol. 9, no. 4, pp. 23-31. ISSN 2354-0079.

[10] ELIÁŠ, Pavol Jr. et al. 2023. New alien vascular plants of Slovakia: records from 2008–2021. In BioInvasions Records, vol. 12, no. 1, pp. 1–30. ISSN 2242-1300.

[11] GOJDIČOVÁ, Ema - CVACHOVÁ, Alžbeta - KARASOVÁ, Emília. 2002. Zoznam nepôvodných, inváznych a expanzívnych cievnatých rastlín Slovenska 2. In Ochrana prírody, no. 21, pp. 59-79. ISSN 2453-8183.

[12] RICHARDSON, David M. - REJMÁNEK, Marcel. 2011. Trees and shrubs as invasive alien species – a global review. In Diversity and Distributions, vol. 17, pp. 788–809. ISSN 1472-4642.

[13] PYŠEK, Petr et al. 2014. Temperate trees and shrubs as global invaders: the relationship between invasiveness and native distribution depends on biological traits. In Biological Invasions, vol. 16, pp. 577-589. ISSN 1573-1464.

[14] VÍTKOVÁ, Michaela et al. 2017. Black locust (Robinia pseudoacacia) beloved and despised: a story of an invasive tree in Central Europe. In Forest Ecology and Management, vol. 384, pp. 287-302. ISSN 0378-1127.

[15] SLABEJOVÁ, Denisa et al. 2023. Comparison of alien Robinia pseudoacacia stands with native forest stands across different taxonomic groups. In Forest Ecology and Management, vol. 548, pp. 1-15. ISSN 0378-1127.

[16] MÁJEKOVÁ, Jana et al. 2023. Structure of forest stands of alien tree Quercus rubra in Central Europe. In Biologia. https://doi.org/10.1007/s11756-023-01502-7 ISSN 1336-9563.

[17] DOSTÁL, Josef – ČERVENKA, Martin. 1991. Veľký kľúč na určovanie vyšších rastlín I. 1. vyd.

Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľstvo, 775 p. ISBN 80-08-00273-5.
[18] DOSTÁL, Josef – ČERVENKA, Martin. 1992. Veľký kľúč na určovanie vyšších rastlín II. 1. vyd. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľstvo, 784 p. ISBN 80-08-00003-1.
[19] TICHÝ, Lubomír. 2002. JUICE, software for vegetation classification. In Journal of Vegetation Science, vol. 13, pp. 451-453. ISSN 1100-9233.
[20] JURKO, Anton. 1990. Ekologické a socioekonomické hodnotenie vegetácie. Bratislava: Príroda, 195 p. ISBN 80-07-00391-6.
[21] DŘEVOJAN, P. 2020. Růstová forma [online]. Pladias – databáze české flóry a vegetace. [cit. 4.3.2024]. Dostupné z: www.pladias.cz
[22] KAPLAN, Zdeněk et al. 2019. Klíč ke květeně České republiky. 2. vyd. Praha: Academia, 1168 p. ISBN 978-80-200-2660-6.
[23] KLOTZ, S. – KŰHN, I. 2002. Ökologische Strategietypen. In: KLOTZ, S. – KŰHN, I. – DURKA, W. (eds). BIOLFLOR: eine Datenbank mit biologisch-ökologischen Merkmalen zur Flora von Deutschland. In Schriftenreihe für Vegetationskunde, vol. 38, pp. 119-126. ISSN 0085-5960.
[24] KLOTZ, S. – KŰHN, I. 2002. Blattmerkmale. In: KLOTZ, S. – KŰHN, I. – DURKA, W. (eds). BIOLFLOR: eine Datenbank mit biologisch-ökologischen Merkmalen zur Flora von Deutschland. In Schriftenreihe für Vegetationskunde, vol. 38, pp. 119-126. ISSN 0085-5960.
[25] ŠTĚPÁNKOVÁ, P. – GRULICH, V. 2020. Funkční typ listů dřevin. [online]. Pladias – databáze české flóry a vegetace. [cit. 4.3.2024]. Dostupné z: www.pladias.cz
[26] SÁDLO, Jiří et al. 2018. Plant dispersal strategies: a new classification based on themultiple dispersal modes of individual species. In Preslia, vol. 90, pp. 1-22. ISSN 0032-7786.
[27] SÁDLO, Jiří – CHYTRÝ, Milan – PYŠEK, Petr. 2007. Regional species pools of vascular plants in habitats of the Czech Republic. In Preslia, vol. 79, pp. 303 – 321. ISSN 0032-7786.
[28] MARHOLD, Karol (ed.). Papraďorasty a semenné rastliny. In MARHOLD, Karol – HINDÁK, František. Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska. Bratislava: Veda, 1998, pp. 333-687. ISBN 80-224-0526-4.
[29] ŠUVADA, Róbert (ed.). 2023. Katalóg biotopov Slovenska (druhé, rozšírené vydanie). Banská Bystrica: Štátna ochrana prírody SR, 511 p. ISBN 978-80-8184-106-4.
[30] HENNEKENS, Stephan M. – SCHAMINÉE, Joop H. J. 2001. TURBOVEG, a comprehensive data base management system for vegetation data. In Journal of Vegetation Science, vol. 12, pp. 589-591. ISSN 1100-9233.
[31] FUTÁK, Ján. Fytogeografické členenie, mapa VII/14. 1:1000000. In MAZÚR, E. (red.). 1980. Atlas Slovenskej socialistickej republiky. Bratislava: Slovenský úrad geodézie a kartografie, Slovenská akadémia vied, 339 s.
[32] BAŽANT, Václav – ÚRADNÍČEK, Luboš. 2018. Keře. 1. vyd. Praha: Academia, 474 p. ISBN 978-80-200-2777-1.

Polymorfizmus BsmI *VDR* génu a hladiny lipidového profilu u jedincov s pľúcnou tuberkulózou

BsmI VDR gene polymorphism and lipid profile levels in subjects with pulmonary tuberculosis

Karolína Kubalová[1]
Školiteľ: Marta Mydlárová Blaščáková[1]
[1]Katedra biológie, FHPV PU, ul. 17. novembra č. 1, 081 16 Prešov,
karolina.kubalova@smail.unipo.sk, marta.blascakova@unipo.sk

Abstrakt

Tuberkulóza patrí medzi najstaršie ochorenia ľudstva. Nízke hladiny vitamínu D_3 ako aj lipidov sú spojené s vyššou náchylnosťou na tuberkulózu a ochorenia kardiovaskulárneho systému. Polymorfizmus BsmI *VDR* génu patrí medzi najčastejšie študované polymorfizmy v súvislosti so vznikom tuberkulózy. Cieľom tejto práce bolo sledovať zastúpenie genotypov a alel, zistiť štatisticky významné rozdiely markerov lipidového profilu v jednotlivých genotypoch polymorfizmu BsmI *VDR* génu medzi kontrolnou skupinou a skupinou pacientov s tuberkulózou. Výsledky našej vedeckej štúdie nepotvrdili súvislosť alely T polymorfizmu BsmI *VDR* génu s pľúcnou tuberkulózou ($p<0,707$). Neparametrickým Mann-Whitneyho U-testom sme zistili štatisticky významné rozdiely vo vybraných markeroch lipidového profilu v jednotlivých genotypoch. Priemerná hodnota HDL cholesterolu bola najnižšia v mutantnom genotype TT (0,68 ± 0,28 mmol/l).

Kľúčové slová: genotyp, lipidy, pľúcna tuberkulóza, *VDR* gén

Abstract

Tuberculosis is one of the oldest diseases of mankind. Low levels of vitamin D_3 as well as lipids are associated with higher susceptibility to tuberculosis and cardiovascular disease. The BsmI polymorphism of the *VDR* gene is one of the most frequently studied polymorphisms in relation to the development of tuberculosis. The aim of this study was to observe the representation of genotypes and alleles, to find statistically significant differences of lipid profile markers in different genotypes of BsmI *VDR* gene polymorphism between control group and tuberculosis patients group. The results of our study did not confirm the association of the T allele of the BsmI *VDR* gene polymorphism with pulmonary tuberculosis ($p<0.707$). By non-parametric Mann-Whitney U-test, we found statistically significant differences in selected markers of lipid profile in individual genotypes. Mean HDL cholesterol was lowest in the TT mutant genotype (0.68 ± 0.28 mmol/l).

Keywords: genotype, lipids, pulmonary tuberculosis, *VDR* gene

Úvod

Tuberkulóza predstavuje jeden z najväčších zdravotných problémov ľudstva [1]. V roku 2022 bola tuberkulóza druhou najčastejšou infekčnou chorobou na svete [2]. Hlavným postihnutým orgánom pri tuberkulóze sú pľúca [3]. Skutočnosť, že len u malej časti infikovaných jedincov sa vyvinie aktívne tuberkulózne ochorenie naznačuje, že genetické pozadie hostiteľa môže mať kľúčovú úlohu v jej rozvoji. Nedávne štúdie podporili dôkazy, že metabolická dráha vitamínu D sa môže podieľať na patogenéze tuberkulózy [4]. Aktívna forma vitamínu D (1-25-dihydroxyvitamín D_3) riadi bunkové funkcie prostredníctvom receptorov vitamínu D (VDR). Zároveň vitamín D dokáže regulovať imunitný systém moduláciou vrodenej a adaptívnej imunity, prostredníctvom aktivácie monocytov, ovplyvňovaním syntézy cytokínov a imunoglobulínov a potláčaním proliferácie lymfocytov [5 – 7]. *VDR* gén plní rozhodujúcu úlohu pri modulácii aktivity monocytov a makrofágov, určuje vrodenú imunitu proti *Mycobacterium tuberculosis* [8]. Jedným z najčastejšie študovaných polymorfizmov *VDR* génu je BsmI. Doposiaľ boli uskutočnené viaceré vedecké štúdie na preskúmanie asociácie polymorfizmu BsmI *VDR* génu s rizikom vzniku tuberkulózy, ale zistenia sú protichodné [9]. Vitamín D a lipidy majú vplyv nielen na vznik tuberkulózy, ale aj na rozvoj kardiovaskulárnych ochorení [10, 11]. Chidambaram et al. [12] uvádzajú, že pacienti s aktívnou tuberkulózou

majú znížené hladiny cholesterolu v sére. Nižšie hladiny LDL-cholesterolu korelujú s rozsiahlejším tuberkulóznym ochorením pľúc. Cieľom tejto práce bolo sledovať zastúpenie genotypov a alel polymorfizmu BsmI *VDR* génu medzi kontrolnou skupinou a skupinou jedincov s tuberkulózou. Ďalším cieľom tejto štúdie bolo zistiť štatisticky významné rozdiely markerov lipidového profilu v jednotlivých genotypoch polymorfizmu BsmI *VDR* génu medzi kontrolnou skupinou a skupinou jedincov s diagnostikovanou pľúcnou tuberkulózou.

1 Materiál a metodika

Výskumný súbor tvorilo 69 jedincov, z toho bolo 34 pacientov s diagnostikovanou tuberkulózou (TBC) a 35 zdravých kontrol (KS). Výskum prebiehal od marca 2022 do marca 2023. Vzorky boli poskytnuté z Národného ústavu tuberkulózy, pľúcnych chorôb a hrudníkovej chirurgie vo Vyšných Hágoch. Do štúdie boli zaradení jedinci s diagnostikovanou pľúcnou tuberkulózou bez ohľadu na pohlavie. Zo štúdie boli vylúčení pacienti s nádorovým ochorením, tehotné ženy, pacienti s inými endokrinnými poruchami. Štúdia sa uskutočnila po získaní písomného informovaného súhlasu všetkých jedincov a bola vykonaná v súlade s etickými zásadami Helsinskej deklarácie. Protokol štúdie bol schválený etickou komisiou Prešovskej univerzity v Prešove (č. ECUP102023PO).

1.1 Molekulárno-genetická analýza

Na molekulárno-genetickú analýzu sme využili vzorky periférnej krvi. Periférna krv bola odobratá do skúmaviek typu Sarstedt s K_3EDTA v objeme 2 – 2,7 ml. Izolácia DNA bola uskutočnená prostredníctvom komerčného kitu NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel, Nemecko). Po izolácii DNA sme uskutočnili genotypovanie vybraného polymorfizmu *VDR* génu (rs1544410 BsmI). Genotypovanie bolo realizované pomocou metódy Real-Time PCR, využitím prístroja StepOne Real-Time PCR systém (Applied Biosystems, USA). Genotypizácia bola vykonaná použitím komerčnej sondy TaqMan genotyping SNP Assay (C_8716062_20) (Thermo Fisher Scientific, USA) podľa štandardného protokolu.

1.2 Biochemická analýza

Na biochemickú analýzu sme využili vzorky periférnej krvi (5,5 ml), ktorá bola odobratá do skúmaviek SARSTEDT. Centrifúgou (MIKRO 200R, Hettich 2405, Nemecko) sme z krvných vzoriek odseparovali krvné sérum. Vzorky sme analyzovali pomocou biochemického analyzátora Cobas Integra 400 plus (Roche, Švajčiarsko). V krvnom sére sme stanovili hladiny vybraných markerov lipidového profilu (CHOL – celkový cholesterol, HDL – lipoproteíny s vysokou hustotou, LDL – lipoproteíny s nízkou hustotou, TG – triacylglyceroly).

1.3 Štatistická analýza

Namerané a vypočítané výsledky sme spracovali v programe Excel 2019 a Statistica ver. 12. Na štatistickú analýzu sme využili Chí-kvadrát test, hodnoty štatistickej významnosti sme vypočítali pomocou online kalkulátora Social Science Statistic. Miera rizika a interval spoľahlivosti bol vypočítaný pomocou online kalkulátora MedCalc statistical software. Kalkulátorom GeneCalc sme zisťovali, či daná populácia jedincov bola v Hardy-Weinbergovej rovnováhe. Neparametrickým Mann-Whitneyho U-testom sme sledovali štatisticky významné rozdiely medzi jedincami v kontrolnej skupine a pacientmi s diagnostikovanou tuberkulózou.

2 Výsledky a diskusia

Demografickú charakteristiku jedincov zaradených do štúdie uvádzame v tabuľke 1. Z tabuľky vyplýva, že najvyššie zastúpenie mali v oboch skupinách muži. Z vekových kategórií to boli jedinci vo veku 35 – 54 rokov. Na základe Chí-kvadrát testu sme nezistili štatisticky významné rozdiely medzi vekom ($p<0,560$) a pohlavím ($p<0,356$) v KS a TBC.

Tab. 1 Demografická charakteristika jedincov výskumného súboru

Charakteristika	TBC	KS	p
Vek (roky)			
16 – 34	6 (17,6 %)	8 (22,9 %)	0,560
35 – 54	16 (47,1 %)	20 (57,1 %)	
55 – 74	9 (26,5)	5 (14,3 %)	
75 – 83	3 (8,8 %)	2 (5,7 %)	
Pohlavie			
Muži	24 (70,6 %)	21 (60,0 %)	0,356
Ženy	10 (29,4 %)	14 (40,0 %)	
Spolu	34 (100,0 %)	35 (100,0 %)	

TBC – pacienti s tuberkulózou, KS – kontrolná skupina, p – hodnota štatistickej významnosti

V tabuľke 2 uvádzame genotypové frekvencie polymorfizmu BsmI *VDR* génu. Na základe hodnôt

uvedených v tabuľke môžeme usúdiť, že najväčšie zastúpenie v skupine TBC aj KS mal genotyp TC. Frekvencia genotypu TC u pacientov s tuberkulózou bola 50 % a v kontrolnej skupine bola 45,71 %. Mutantný genotyp TT sa vyskytoval v nasledujúcich frekvenciách: KS 20 % a TBC 14,71 %. Prostredníctvom Chí-kvadrat testu sme nezistili štatistickú významnosť ($\chi 2$=0,350; p<0,840) v zastúpení genotypov medzi kontrolnou skupinou a skupinou jedincov s diagnostikovanou tuberkulózou.

Alelové frekvencie polymorfizmu BsmI *VDR* génu uvádzame v tabuľke 3. V skupine pacientov s tuberkulózou a v kontrolnej skupine mala vyššie zastúpenie alela C (TBC = 60,29 %, KS = 57,14 %). Mutantná alela T sa vyskytovala v oboch skupinách v nižšej frekvencii, ako pôvodná alela C. Prostredníctvom Chí-kvadrát testu sme nezistili štatistickú významnosť ($\chi 2$=0,141; p<0,707) v zastúpení alel medzi KS a TBC.

V tabuľke 4 uvádzame hladiny vybraných parametrov lipidového profilu v sledovaných skupinách jedincov v jednotlivých genotypoch polymorfizmu BsmI *VDR* génu. Neparametrickým Mann-Whitneyho U-testom sme zistili štatistickú významnosť vo všetkých genotypoch (TT, TC, CC) medzi KS a TBC v parametri HDL. Priemerné hodnoty HDL cholesterolu boli v skupine TBC vo všetkých sledovaných genotypoch nižšie, ako je referenčné rozmedzie (muži: >1,0 mmol/l; ženy >1,30 mmol/l). Z výsledkov našej štúdie vyplýva, že priemerná hodnota HDL cholesterolu bola v mutantnom genotype najnižšia (0,68 ± 0,28 mmol/l). Hodnoty LDL cholesterolu boli vo všetkých genotypoch v rámci referenčného rozmedzia (<4,10 mmol/l). Štatistickú významnosť v biochemickom parametri LDL sme zistili v genotype TC (p<0,005) a v genotype CC (p<0,012).

Pľúcna tuberkulóza je významným problémom verejného zdravia [13]. Nachádza sa na druhom mieste po HIV (vírus ľudskej imunodeficiencie) v úmrtnosti v dôsledku jediného infekčného agensu. Génová mutácia vo *VDR* géne môže významne zvýšiť riziko pľúcnej TBC [9]. Polymorfizmus BsmI *VDR* génu sa považuje za jeden z možných faktorov, ktoré môžu prispievať k predispozícii pľúcnej tuberkulózy [14].

Autori vedeckých štúdií Rashedi et al. [15], Cao et al. [16] vo svojich štúdiách nezistili štatisticky významnú asociáciu medzi polymorfizmom BsmI *VDR* génu s náchylnosťou na vznik tuberkulózy. Rashedi et al. [15] uvádzajú, že v skupine pacientov bola frekvencia alely B (T) 48,22 % a frekvencia alely b (C) 51,78 %. K podobným záverom ako [15, 16] sme dospeli aj v našej štúdii. Frekvencia alely T bola v našej skupine pacientov s diagnostikovanou tuberkulózou 42,86 % a alely C bola 57,14 %. Devi et al. [17] vo svojej vedeckej štúdii u jedincov severovýchodnej Indie dospeli k opačnému záveru – polymorfizmus BsmI *VDR* génu významne súvisel so zvýšeným rizikom vzniku pľúcnej tuberkulózy (p<0,001). Mohammadi et al. [18] uvádzajú, že polymorfizmus BsmI *VDR* génu bol významne spojený s náchylnosťou na tuberkulózou v iránskej populácii u jedincov s genotypom BB (TT) (p<0,02).

Lee et al. [19] v taiwanskej populácii zistili, že jedinci s genotypom GG (CC) mali štatisticky významne vyššiu náchylnosť na vznik tuberkulózy (p<0,034). V našej štúdii sme nepotvrdili, že mutantný genotyp TT je spojený s náchylnosťou na tuberkulózu (p<0,840).

Biologické pohlavie a vek sú dôležitými determinantami zdravia, pretože pohlavné zmeny majú vplyv na prevalenciu, prejav a liečbu tuberkulózy [20]. Sinaga, Amir a Siagian [21] uskutočnili vedeckú štúdiu u jedincov čínskej populácie, v ktorej sa zamerali na demografickú charakteristiku jedincov s tuberkulózou. Zistili, že najvyššie zastúpenie mali jedinci vo vekovej skupine 35 – 54 rokov, čo je v súlade s našou štúdiou. Marpaung et al. [22] vo svojej štúdii u jedincov indonézskej populácie zistili vyššiu prevalenciu tuberkulózy u mužov ako u žien. Podobné výsledky sme zistili aj my v našom výskumnom súbore jedincov.

Znížené hladiny vitamínu D, ako aj lipidov podporujú patogenézu nielen kardiovaskulárnych ochorení, ale aj chronických zápalových procesov postihujúcich dýchacie cesty vrátane tuberkulózy [23, 11]. Preto v našej štúdii sme sa rozhodli porovnať aj hladiny vybraných markerov lipidového profilu v jednotlivých genotypoch polymorfizmu BsmI *VDR* génu. Vo všetkých genotypoch (TT, TC, CC) sme v skupine pacientov s TBC pozorovali významne nižšie hladiny HDL cholesterolu ako je referenčné rozmedzie, pričom v genotype TT boli hodnoty HDL najnižšie (0,68 ± 0,28 mmol/l). V genotype TC a CC sme pozorovali štatistickú významnosť v parametroch (CHOL, HDL a LDL).

Issa et al. [24] v brazílskej populácie zistili, že jedinci s genotypom CC mali nižšie hladiny LDL (3,31 ± 1,07 mmol/l) v porovnaní s jedincami s genotypom TC (4,26 ± 1,68 mmol/l). V našej štúdii sme dospeli k podobnému záveru. Genotyp CC bol spojený s nižšími hladinami LDL (1,83 ± 0,83 mmol/l)

v porovnaní s genotypom TC (2,00 ± 0,89 mmol/l) v skupine pacientov s TBC.

Na základe výsledkov biochemickej, ako aj molekulárno-genetickej analýzy v našej štúdii konštatujeme, že je potrebný ďalší vedecký výskum vplyvu polymorfizmu BsmI *VDR* génu v súvislosti so vznikom tuberkulózy ako aj sledovanie vzťahov medzi uvedeným polymorfizmom a hladinami lipidového profilu.

Záver

Náchylnosť na tuberkulózu je ovplyvnená mnohými ovplyvniteľnými a neovplyvniteľnými faktormi. Nižšie hladiny vitamínu D sa spájajú so zvýšenou náchylnosťou na tuberkulózu. Na základe výsledkov našej štúdie môžeme konštatovať, že sme nepotvrdili spojitosť alely T polymorfizmu BsmI *VDR* génu s pľúcnou tuberkulózou ($p<0,707$). V mutantnom genotype TT sme zistili štatistickú významnosť v parametri HDL ($p<0,009$). Prostredníctvom štatistickej analýzy sme zistili významné rozdiely vo vybraných markeroch lipidového profilu (CHOL, HDL, LDL) v jednotlivých genotypoch. Na základe výsledkov našej štúdie odporúčame do budúcna zväčšiť súbor jedincov, merať koncentrácie vitamínu D_3 a uskutočniť aj molekulárno-genetickú analýzu ďalších polymorfizmov *VDR* génu.

Použitá literatúra

[1] SOLOVIČ, I. 2004. Tuberkulóza na začiatku 21. storočia – praktický pohľad. In Via practica, roč. 4, č. 2004, s. 215-219. ISSN 1339-424X.

[2] WHO: Global tuberculosis report [online]. WHO: 2023 [cit. 22.2.2024]. Dostupné z: https://www.who.int/publications/m/item/global-tuberculosis-report-factsheet-2023

[3] SOLOVIČ, I. 2019. Tuberkulóza – aktuálny problém aj v novom miléniu. In Neurologie pro praxi, roč. 20, č. 2, s. 91-97. ISSN 1803-5280.

[4] WANG, Y. and LI, H. 2019. A meta-analysis on associations between vitamin D receptor genetic variants and tuberculosis. In Microbial Pathogenesis, vol. 130, no. 2019, pp. 59-64. ISSN 0882-4010.

[5] SALIMI, S. et al. 2014. Association between vitamin D receptor polymorphisms and haplotypes with pulmonary tuberculosis. In Biomedical reports, vol. 3, no. 2, pp. 189-194. ISSN 2049-9442.

[6] GOU, X. et al. 2018. The association between vitamin D status and tuberculosis in children. In Medicine, vol. 97, no. 35. ISSN 1536-5964.

[7] PAPAGNI, R. et al. 2022. Impact of vitamin D in prophylaxis and treatment in tuberculosis patients. In International Journal of Molecular Sciences, vol. 23, no. 3860, pp. 1-12. ISSN 1422-0067.

[8] PANWAR, A. et al. 2016. 25-Hydroxy vitamin D, vitamin D receptor and Toll-like receptor 2 polymorphisms in Spinal tuberculosis. In Medicine, vol. 95, no. 17. ISSN 1536-5964.

[9] WU, Y. et al. 2013. Association of vitamin D receptor BsmI gene polymorphism with risk of tuberculosis: A meta-analysis of 15 studies. In Plos One, vol. 8, no. 6. ISSN 1932-6203.

[10] AWASTHI, R. et al. 2023. FokI and BsmI gene polymorphism of vitamin D receptor and essential hypertension: a mechanistic link. In Clinical Hypertension, vol. 2023, no. 29. pp. 1-12. ISSN 2056-5909.

[11] MANI, A. P. et al. 2023. Assessment of lipid profile in patients with pulmonary tuberculosis: An observational study. In Cureus, vol. 15, no. 5. ISSN 2168-8184.

[12] CHIDAMBARAM, V. et al. 2021. Higher serum cholesterol levels are associated with reduced systemic inflammation and mortality during tuberculosis treatment independent of Body Mass Index. In Frontiers in Cardiovascular Medicine, vol. 2021, no. 8. ISSN 2297-055X.

[13] KAFLE, S. et al. 2021. Association of vitamin D deficiency with pulmonary tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. In Cureus, vol. 13, no. 9. ISSN 2168-8184.

[14] AREESI, M. Y. et al. 2017. A reappraised meta-analysis of the genetic association between vitamin D receptor BsmI (rs1544410) polymorphism and pulmonary tuberculosis risk. In Bioscience reports, vol. 37, no. 3. pp. 1-14. ISSN 1573-4935.

[15] RASHEDI, J. et al. 2014. Vitamin D receptor gene polymorphism and vitamin D plasma concentration: correlation with susceptibility to tuberculosis. In Advanced Pharmaceutical Bulletin, vol. 4, no. 2, pp. 607-611. ISSN 2251-7308.

[16] CAO, Y. et al. 2012. Vitamin D receptor genetic polymorphisms and tuberculosis among Chinese Han ethnic group. In Chinese Medical Journal, vol. 125, no. 5, pp. 920-925. ISSN 2542-5641.

[17] DEVI, K. R. et al. 2018. Association of VDR gene polymorphisms and 22bp deletions in the promoter region of TLR2△22 (-196-174) with increased risk of pulmonary tuberculosis: A case-control study in tea garden communities of Assam. In Journal of Clinical

Laboratory Analysis, vol. 32, no. 7, pp. 1-14. ISSN 1098-2825.
[18] MOHAMMADI, A. et al. 2020. Vitamin D receptor Apai (rs7975232), BsmI (rs1544410), FokI (rs2228570), and TaqI (rs731236) gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis in an Iranian population: A systematic review and meta-analysis. In Journal of Microbiology, Immunology and Infection, vol. 53, no. 6, pp. 827-835. ISSN 1684-1182.
[19] LEE, S. W. et al. 2016. VDR and VDBP genes polymorphisms associated with susceptibility to tuberculosis in a Han Taiwanese population. In Journal of microbiology, immunology and infection, vol. 49, no. 5, pp. 783-787. ISSN 1995-9133.
[20] HUMAYUN, M. et al. 2022. Effect of gender on clinical presentation of tuberculosis (TB) and age-specific risk of TB, and TB-Human Immunodeficiency Virus Coinfection. In Open Forun Infectious Diseases, vol. 9, no. 10, pp. 1-9. ISSN 2328-8957.
[21] SINAGA, B. Y. M. et al. 2018. The role of FokI polymorphism of vitamin D receptor gene and vitamin D level in multidrug-resistant tuberculosis occurrence in Medan city, Indonesia. In Archives of Medical Science-Civilization Diseases, vol. 218, no. 3, pp. 153-157. ISSN 2451-0637.
[22] MARPAUNG, D. O. et al. 2021. The association between vitamin D receptor gene FokI polymorphism and pulmonary tuberculosis. In Respiratory Science, vol. 2, no. 1, pp. 1-7. ISSN 2747-1306.
[23] MURDACA, G. and S. GANGEMI. 2023. Vitamin D in Health and disease. In Biomedicines, vol. 11, no. 1, pp. 1-4. ISSN 2227-9059.
[24] ISSA, C. T. M. I. et al. 2016. Relationship between cardiometabolic profile, vitamin D status and BsmI polymorphism of the VDR gene in non-institutionalized elderly subjects Cardiometabolic profile, vitamin D status and BsmI polymorphism of the VDR gene in non-institutionalized elderly subjects. In Experimental Gerontology, vol. 81, no. 2016, pp. 56-64. ISSN 1873-6815.

Tab. 2 Genotypové frekvencie polymorfizmu BsmI *VDR* génu v sledovanej populácii

Genotypové frekvencie										
Skupina	N	TT		TC		CC		HWE	$\chi 2$	p
		N	%	N	%	N	%			
KS	35	7	20,00	16	45,71	12	34,29	0,544	0,350	0,840
TBC	34	5	14,71	17	50,00	12	35,29	0,974		

KS – kontrolná skupina, TBC – pacienti s tuberkulózou, HWE – Hardy-Weinbergov zákon, $\chi 2$ – chí kvadrát test, p – hodnota štatistickej významnosti

Tab. 3 Alelové frekvencie polymorfizmu BsmI *VDR* génu v sledovanej populácii

Alelové frekvencie									
Skupina	N	T		C		$\chi 2$	p	OR	95% CI
		N	%	N	%				
KS	35	30	42,86	40	57,14	0,141	0,707	0,878	0,446 – 1,730
TBC	34	27	39,71	41	60,29				

KS – kontrolná skupina, TBC – pacienti s tuberkulózou, OR – miera rizika, p –hodnota štatistickej významnosti, CI – interval spoľahlivosti, $\chi 2$ – chí kvadrát test

Tab. 4 Hladiny vybraných parametrov lipidového profilu v jednotlivých genotypoch polymorfizmu BsmI *VDR* génu

Genotyp									
	TT			TC			CC		
Parameter	**KS**	**TBC**	**p**	**KS**	**TBC**	**p**	**KS**	**TBC**	**p**
mmol/l	**(n = 7)**	**(n = 5)**		**(n = 16)**	**(n = 17)**		**(n = 12)**	**(n = 12)**	
CHOL	4,62 ± 0,82	3,18 ± 1,16	0,074	4,80 ± 1,25	3,34 ± 1,09	0,003**	4,45 ± 0,48	3,07 ± 1,06	0,002**
HDL	1,65 ± 0,41	0,68 ± 0,28	0,009**	1,36 ± 0,43	0,86 ± 0,33	0,001***	1,47 ± 0,45	0,81 ± 0,20	0,001***
LDL	2,52 ± 0,48	1,95 ± 1,02	0,194	3,08 ± 1,02	2,00 ± 0,89	0,005**	2,66 ± 0,39	1,83 ± 0,83	0,012*
TG	1,01 ± 0,39	1,34 ± 0,56	0,33	1,26 ± 0,59	1,26 ± 0,59	0,928	0,99 ± 0,46	1,01 ± 0,32	0,603

KS – kontrolná skupina, TBC – pacienti s tuberkulózou, p – hodnota štatistickej významnosti, CHOL – cholesterol, HDL – lipoproteíny s vysokou hustotou, LDL – lipoproteíny s nízkou hustotou, TG – triacylglyceroly

Vplyv zložitosti jazyka na čitateľnosť ekonomických textov

The Effect of Language on the Readability of Economic Texts

Mária Pappová[1]
Školiteľ: Michal Munk[1]
Konzultant: Ľubomír Benko[1]
[1]Katedra informatiky, FPVaI UKF, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,
maria.pappova2@ukf.sk, mmunk@ukf.sk, lbenko@ukf.sk

Abstrakt

V tejto práci sa zameriavame na analýzu čitateľnosti ekonomického textu v slovenskom a anglickom jazyku. Cieľom je porovnať výsledky rôznych metrík čitateľnosti a zistiť, či existuje zhoda v hodnotení zložitosti textu v závislosti od jazyka. Analýza ukázala, že Mistríkova miera čitateľnosti nie je vhodná pre anglický jazyk. Ostatné metriky vyhodnotili oba texty ako zložité (vysoko odborné), vhodné pre vysokoškolsky vzdelaných čitateľov. Niektoré metriky reagovali na zložitosť textu bez ohľadu na jazyk, s malými rozdielmi v hodnotení medzi jazykmi. Výsledky naznačujú, že pri hodnotení čitateľnosti je dôležité zvoliť vhodné metriky s ohľadom na jazyk. Niektoré metriky sú univerzálnejšie, zatiaľ čo iné sú jazykovo špecifické. V budúcnosti bude skúmaných viac ekonomických textov, najmä povinne zverejňované informácie komerčnými bankami.

Kľúčové slová: Metriky zložitosti, čitateľnosť, Flesch Reading Ease, SMOG Index, Gunning Fog Index, ARI, Mistríkova miera obťažnosti.

Abstract

This study centres on the evaluation of the legibility of economic texts written in English and Slovak. The objective is to conduct a comparative analysis of various readability metrics to ascertain whether or not the evaluation of text complexity differs by language. According to the results of the analysis, Mistrík's rate of comprehension is unsuitable for the English language. Other metrics determined that both texts were excessively technical and appropriate for readers with a university education. Certain metrics made an assessment of the difficulty of text regardless of the language used, with minimal variation in ratings across languages. It is evident that the utilisation of language-specific metrics is crucial in the assessment of comprehensibility While some metrics are more universal, others are specific to particular languages. Further analysis will be conducted on economic texts in the future, with a particular focus on the mandatory disclosure of information by commercial institutions.

Key Words: Complexity metrics, Readability, Flesch Reading Ease, SMOG Index, Gunning Fog Index, ARI, Mistrík's measure of difficulty.

Úvod

Zložitosť textu sa vzťahuje na úroveň obťažnosti, s akou je možné pochopiť písaný text. Posúdenie zložitosti textu je kľúčové v rôznych oblastiach vrátane vzdelávania alebo tvorby obsahu, pretože pomáha určiť vhodnú úroveň čitateľnosti pre konkrétne publikum. Jazyková zložitosť textu sa meria na viacerých úrovniach, napr. na úrovni morfológie, syntaxe, lexikológie, preto rozlišujeme medzi gramatickou (morfológia a syntax) a lexikálnou zložitosťou. Obrazom jazykovej zložitosti textu je jeho čitateľnosť, inak povedané aj jazyková miera zložitosti, t.j. čím je text čitateľnejší, tým jeho obsah je jazykovo menej zložitejší.

Jazyková zložitosť sa najčastejšie meria na základe dĺžky a frekvencie, ale aj prostredníctvom indexov čitateľnosti. Čitateľnosť sa vo všeobecnosti meria kľúčovými komponentmi – typografiou, obsahom a skóre čitateľnosti [1].

Typografia pokrýva prezentáciu textu – zohľadňujú sa atribúty ako veľkosť písma, výška riadku atď. **Obsah** má viac štatistický a lexikálny prístup k slovám v texte. **Skóre čitateľností** sú približné; slúžia ako indikátor, ktorý hodnotí mieru jednoduchosti, s akou je možné dokument prečítať a pochopiť. Jedným z nedostatkov skóre čitateľnosti je, že nezohľadňujú gramatiku, pravopis, intonáciu ani žiadne iné kvalitatívne aspekty textu. Text plný gramatických chýb môže získať rovnaké skóre čitateľnosti ako text s dokonalou gramatikou [2].

Metriky zložitosti textu sú kvantitatívne techniky, ktoré sú používané na odhad úrovne zložitosti písaného textu – vyjadrujú už vyššie spomenuté skóre alebo index čitateľnosti. Tieto vzorce analyzujú rôzne jazykové vlastnosti, ako je dĺžka slova, štruktúra vety alebo syntaktická zložitosť. [3].

V rámci nášho výskumu sa chceme zamerať na porovnanie výsledkov rôznych metrík čitateľnosti, ktoré si predstavíme a zistiť, či existuje zhoda v hodnotení zložitosti textu v závislosti od jazyka. Porovnávanie bude prebiehať na dokumente finančného charakteru, od komerčnej banky, ktorý bude v slovenskom aj v anglickom jazyku.

V článku sa najskôr zameriame na analýzu metrík zložitosti, ktoré sa využívajú najmä pre také texty, ktoré majú finančný charakter. Ďalej sa zameriame na metodiku výskumu, v ktorej si bližšie charakterizujeme naše skúmané dokumenty a použité nástroje vo výskume. V neposlednom rade si vyhodnotíme dosiahnuté výsledky a v závere načrtneme aj budúci výskum.

1 Analýza súčasného stavu

Čítanie je základná zručnosť, ktorá otvára svet vedomostí a informácií. Jeho zvládnutie si však vyžaduje, aby sme vyvinuli komplexný súbor schopností. Čítanie s porozumením zahŕňa vytvorenie kognitívnej reprezentácie textu v mysli čitateľa. Výsledkom tohto postupu je súdržná kognitívna reprezentácia textu. [3,4]. Kvantitatívne hodnotenie čitateľnosti pomáha udržiavať ideálny stupeň čitateľnosti pre cieľové publikum. Implementáciou metrík čitateľnosti umožňuje efektívnejšie využitie času hodnotiteľov textu a kvalitnejšie spracovanie hodnotených materiálov, pretože testovanie čitateľnosti môže zvýšiť validitu a spoľahlivosť nástrojov zberu dát, čím sa zníži potreba manuálneho prehodnocovania a zvýši sa dôveryhodnosť hodnotiteľa [5].

Odlišný spôsob zisťovania zložitosti textu je založený na objektívnych parametroch textu a je nezávislý od posudzovateľov alebo žiakov. Týmito parametrami sú obyčajne dĺžka vety, zložitosť vety, množstvo a obťažnosť pojmov, miera opakovateľnosti pojmov, atď. [6]. Zložitosť určitého textu pre čitateľa je teda ovplyvňovaná lexikálnymi, ale aj syntaktickým faktormi. Tieto sú začleňované do tzv. vzorcov pre výpočet obťažnosti (zložitosti) textu [7].

Jednotlivé ukazovatele sú potom včlenené do vzorca, do ktorého sa dosadia údaje z textu a pomocou ktorého sa vypočíta obťažnosť textu. Existuje niekoľko desiatok vzorcov na výpočet obťažnosti textu, ktoré sa líšia zdôrazňovaním alebo naopak potlačovaním niektorých textových parametrov [6,8].

Čo sa týka používania správnej terminológie, pri používaní metrík čitateľnosti existujú v zásade dva pojmy: komplexnosť a zložitosť, ktoré bývajú častokrát použité ako synonymá, ale sú to skôr pseudosynonymá. Komplexnosť sa týka prirodzenej štruktúry a zložitosti úlohy bez ohľadu na výkon študenta. Na druhej strane, zložitosť je relatívna a zvažuje, aká náročná je úloha pre konkrétnu skupinu študentov na základe ich zručností, vedomostí a prostredia. Pochopenie tohto rozdielu je kľúčom k navrhovaniu efektívnych vzdelávacích materiálov a v konečnom dôsledku aj textu, ktorý bude zrozumiteľný pre konkrétnu skupinu čitateľov [9].

1.1 Metriky zložitosti

Medzi metriky, ktoré sa používajú pri skúmaní finančných a bankových textov, ako aj pri všeobecnom overovaní vhodnosti textu pre určité publikum, patria nasledovne predstavené:

Flesch-Kincaidove testy zložitosti textu, sú navrhnuté pre meranie úrovne obťažnosti anglického textu. Dva bežne používané vzorce čitateľnosti sú **Flesch Reading-Ease** [10] a **Flesch-Kincaid Grade Level** [11]. Napriek použitiu rovnakých základných metrík, konkrétne dĺžky slova a dĺžky vety, sú týmto metrikám priradené odlišné váhové faktory – Flesch skóre odzrkadľuje, ako čitateľný je text. Flesch Reading Ease skóre je medzi 1 a 100 a Flesch Kincaid Grade Level odráža americký vzdelávací systém. Vzorec pre Flesch Reading Ease [10][12] je predstavený ako prvý, za ním je predstavený Flesch Kincaid Grade Level [11]:

$$FRES = 206{,}835 - 1{,}015\left(\frac{počet\ slov}{počet\ viet}\right) - 84{,}6\left(\frac{počet\ slabík}{počet\ slov}\right)$$ (1), [10],

$$FKRA = 0{,}39\left(\frac{počet\ slov}{počet\ viet}\right) + 11{,}8\left(\frac{počet\ slabík}{počet\ slov}\right) - 15{,}59$$ (2), [11].

Na Tabuľke 1 nižšie je zobrazený prepočet skóre na obťažnosť textu podľa stupňa štúdia (USA) metrík [12]. Hneď pod ňou na Tabuľke 2 je zobrazený prepočet metriky Flesch-Kincaid Grade Level:

Tabuľka 1 Prepočtová tabuľka metriky Flesch Reading Ease Zdroj: [12]

Skóre	Úroveň ročníka (USA)
100 – 90	5. ročník
90 – 80	6. ročník
80 – 70	7. ročník
70 – 60	8. a 9. ročník
60 – 50	Stredná škola (1. – 2. ročník)
50 – 30	Študent vysokej školy
30 – 10	Absolvent vysokej školy
10 – 0	Profesionál

Tabuľka 2 Prepočtová tabuľka metriky Flesch-Kincaid Grade Level
Zdroj: [11]

Skóre	Školský ročník (USA)	Vek čitateľov
0 – 1	Predškolák – 1.ročník	3 – 7 rokov
1 – 5	1. – 5. ročník	7 – 11 rokov
5 – 11	5. – 11. ročník	11 – 17 rokov
11 – 18 a viac	11. – 18. ročník	17 a viac rokov

Mohli by sme teda povedať, že vo Flesch Reading-Ease platí, že *čím vyššie je skóre čitateľnosti, tým ľahšie sa číta text,* na rozdiel od iných metrík zmien, kde je nižšie skóre jednoduchšie.

Nevýhodou tejto metriky však je, že bola vyvinutá pre anglický jazyk, ktorý je považovaný za nízko flektívny (neohybný)[13]. To znamená, že napríklad nemusí kvalitne ohodnotiť vysoko flektívne jazyky, v ktorých sú prítomné vyššie špecifiká, ako napríklad skloňovanie, časovanie a jazykové obraty, ktoré môžu ovplyvniť čitateľnosť textu.

Čo sa týka limitácii týchto dvoch veľmi podobných metrík, keďže vzorce zložitosti boli vyvinuté pre školské knihy, vykazujú slabé stránky v porovnaní s priamym testovaním použiteľnosti s typickými čitateľmi. Zanedbávajú rozdiely medzi čitateľmi a obsahom, rozložením textu a pomôcok na vyhľadávanie informácií. Napríklad pangram *"Cwm 9ord-bank glyphs vext quiz,"* má skóre ľahkého čítania 100 a skóre na úrovni 0,52 napriek svojim nejasným slovám [14]. Ďalším problémom pri Flesch Reading-Ease môže byť napríklad to, že bol vyvinutý pre anglický jazyk a jeho výsledky sú ovplyvnené jazykovými charakteristikami tohto jazyka [13]. To znamená, že napríklad nemusí kvalitne ohodnotiť vysoko flektívne jazyky, v ktorých sú prítomné vyššie špecifiká, ako napríklad skloňovanie, časovanie a jazykové obraty, ktoré môžu ovplyvniť čitateľnosť textu.

Metriku použili napríklad v štúdií [15], kde bolo použité porovnanie Flesch-Kincaid testu a Gunning Fog Index-u, ktorý si predstavíme nižšie. Štúdia skúma čitateľnosť informácií o spoločnostiach aplikovaním troch rôznych meraní na vzorke 10-tísíc záznamov, ktoré boli zbierané v rokoch 1994-2007. V ďalšej štúdii [16] autori skúmali vzťah medzi čitateľnosťou textu výročných správ a podstupovaním bankového rizika v krajinách Rady pre spoluprácu v Perzskom zálive. Použitím skóre Flesh-Reading-Ease a skóre Flesh-Kincaid Grade bolo zistené, že ľahko čitateľné výročné správy sú spojené s vyššou pravdepodobnosťou, že banky budú trpieť finančnými problémami. Tento výsledok možno pripísať aj skutočnosti, že banky GCC majú prísnu kultúru a formalizujú postupy, na ktoré sa manažéri bánk spoliehajú pri zvládaní nepríjemných okolností, ako je rizikové správanie.

Ďalšou používanou metrikou čitateľnosti je **Gunning-Fog Index** [17]. Pôvod tejto metriky sa pripisuje americkému vydavateľovi učebníc Robertovi Gunningovi, ktorý zistil, že väčšina absolventov stredných škôl nevie čítať. [2]. Jeho názor bol taký, že noviny a obchodné dokumenty sú plné „hmly“ a zbytočnej zložitosti. Na rozdiel od Flesch Reading Ease, Gunning Fog nevydáva číselné skóre. Namiesto toho Gunning Fog odhaduje index, ktorý predstavuje roky formálneho vzdelávania, ktoré človek potrebuje, aby porozumel textu pri prvom čítaní [17,18]. Vzorec pre výpočet je uvedený nižšie:

$$FOG\ Index = 0{,}4\left[\left(\frac{počet\ slov}{počet\ viet}\right) + 100\left(\frac{počet\ zložitých\ slov}{počet\ slov}\right)\right]$$ (3), [17].

Podľa článkov [17][18] môžeme nižšie vidieť v Tabuľke 3 úroveň zložitosti v texte podľa skóre:

Tabuľka 3 Prepočtová tabuľka pre metriku Gunning Fog Index
Zdroj: [18]

Fog Index	Stupeň čitateľnosti podľa ročníka (USA)
17 a viac	Absolvent vysokej školy
16	Štvrták na vysokej škole
15	Tretiak na vysokej škole
14	Druhák na vysokej škole
13	Prvák na vysokej škole
12	Štvrták na strednej škole
11	Tretiak na strednej škole
10	Druhák na strednej škole
9	Prvák na strednej škole
8	Ôsmy ročník
7	Siedmy ročník
6	Šiesty ročník

Metrika bola použitá v článku, odWrigley Kelly a kol. [19]. Cieľom tejto štúdie bolo posúdiť kvalitu a čitateľnosť online informácií o COVID-19 pomocou 6 overených nástrojov. Ide o prierezovú štúdiu. „COVID-19“ bol vyhľadávaný v troch najpopulárnejších anglických vyhľadávačoch. Kvalita bola hodnotená pomocou skóre DISCERN, referenčných kritérií Journal of the American Medical Association a kódexu správania sa nadácie Health On the Net. Čitateľnosť

bola hodnotená pomocou Flesch Reading Ease Score, Flesch-Kincaid Grade Level a Gunning-Fog Index.

Ďalšou metrikou je **SMOG Index** (angl. Simple Measure of Gobbledygook) [20]. Metrika odhaduje počet rokov vzdelávania, ktoré človek potrebuje, aby porozumel písanému textu. Je považovaná za „zlatý štandard" pri meraní lekárskych textov v zdravotníctve – v štúdii od Fitzsimmonsa a kol. [21] bolo zistené, že metrika Flesch-Kincaid výrazne podcenila ťažkosti s čítaním v porovnaní s metrikou SMOG.

Metrika je výnimočná v tom, že berie do úvahy viacslabičné slová [20]. Stupeň poskytuje koreláciu 0,985 so štandardnou chybou 1,5159 stupňa so známkami čitateľov, ktorí 100% rozumeli testovacej vzorke textov [22,23]. Vzorec na výpočet tejto metriky je nasledovný [20]:

$$SMOG = 1{,}0430 - \sqrt{počet\ viacslabičných\ slov * \frac{30}{počet\ viet}} + 3{,}1291$$

(4), [20].

Podľa článku [24] uvádzame približný prevod medzi úrovňou vzdelania a skóre čitateľnosti SMOG (Tabuľka 4).

Tabuľka 4 Prepočtová metrika SMOG Index
Zdroj: [23]

Skóre	Stupeň vzdelania
4,9 alebo menej	Základná škola (1.-4. ročník)
5 – 8,9	Základná škola (5.-9. ročník)
9 – 12,9	Stredná škola
13 – 16,9	Vysoká škola
17 a viac	Absolvent vysokej školy

Jedným z obmedzení, ktoré táto metrika predstavuje, je počet viet, ktorý musí byť viac ako 30 [20] pretože texty s menej ako 30 vetami sú pre túto metriku neplatné.

Automatizovaný index čitateľnosti (angl. Automated Readability Index – ARI) je metrika zložitosti anglických textov, ktorá zohľadňuje znaky, slová a vety, pričom ponecháva diskutabilné metriky, ako sú „komplexné slová" [2]. Vzorec na výpočet tejto metriky je uvedený nižšie [25]:

$$ARI = 4{,}71\left(\frac{počet\ znakov}{počet\ slov}\right) + 0{,}5\left(\frac{počet\ slov}{počet\ viet}\right) - 21{,}43$$ (5), [25],

kde znaky je počet písmen a číslic, slová rátajú s počtom medzier, ktoré hodnotiteľ spočítal ručne pri vývoji vyššie uvedeného vzorca. Neceločíselné skóre sa vždy zaokrúhľuje nahor na najbližšie celé číslo, takže skóre 10,1 alebo 10,6 sa prevedie na 11 [25].

Tabuľka 5 nižšie zobrazuje úroveň zložitosti textu podľa samotného skóre [25]:

Tabuľka 5 Prepočtová tabuľka metriky ARI
Zdroj: [24]

Skóre	Zodpovedajúca úroveň školy (USA)	Obťažnosť textu
90–100	5. ročník	Mimoriadne ľahko čitateľný
80–90	6. ročník	Konverzačná angličtina pre spotrebiteľov
70–80	7. ročník	Celkom ľahko čitateľný
60–70	8. a 9. ročník	Ľahko pochopia 13 až 15-roční žiaci
50–60	10. až 12. ročník	Trochu náročné na čítanie
30 – 50	Vysoká škola	Ťažko sa číta
0–30	Absolvent vysokej školy	Mimoriadne ťažko čitateľný

Pre slovenský jazyk sú nám známe práve dve metriky zložitosti, ktoré sa zameriavajú všeobecne na hocijaký text, a to **Mistríkov vzorec obťažnosti textu** a **Nestlerovej vzorec** [9][26], my si však popíšeme iba prvý spomenutý. Místríkov vzorec obťažnosti sa vypočítava pomocou indexu opakovania fráz [27]. To znamená, že čím viac slov sa v odbornom texte opakuje, tým sa text ľahšie číta. Mistrík definuje mimotextovú skutočnosť ako informáciu, ktorá je uložená v podvedomí, nerealizuje sa verbálne ani vizuálnymi prostriedkami, ale iba na základe okolnosti, ktoré sú v konkrétnej situácii evidentné, samozrejmé [27]. Rozlišuje dva druhy textov: vecné texty a umelecké texty. Vecné texty sú strohé, ich funkciou je informovať. Delia sa na tri skupiny [28]:

- publicistické,
- odborné a náučné,
- administratívno-právne texty.

Umelecké texty majú hlavne funkciu estetickú, ich úlohou je vyvolať u čitateľa nevšedné pocity, nálady estetické zážitky. Podľa spôsobu spracovania rozlišujeme tri druhy umeleckej literatúry [28], a to prózu, poéziu, drámu.

Mieru zrozumiteľnosti (R) vypočítame podľa vzorca [27,28]:

$$R = 50 - \frac{V*S}{I_{(i)}} \text{ (6), [27],}$$

kde:

• V = priemerná dĺžka viet,

• S = priemerná dĺžka viet podľa počtu slov, 31

• I(i) = index opakovania slov, ktorý sa vypočíta ako:

$$I_{(i)} = \frac{N}{L} \text{ (7), [27],}$$

kde:

• N = počet všetkých lexikálnych jednotiek textu,

• L = počet rôznych lexikálnych jednotiek.

Index opakovania slov má vplyv na obťažnosť textu, čo znamená, že častejšie opakovanie slov znižuje jeho obťažnosť. Táto skutočnosť je dôležitá najmä pre výkladové texty. Hodnota zrozumiteľnosti textu (R) sa porovnáva so škálou, kde *texty s najnižšou obťažnosťou majú hodnoty od 40 do 50 bodov a texty s najvyššou obťažnosťou (na hranici zrozumiteľnosti) majú 0 – 10 bodov* [29].

Jednou z pozoruhodných výhod Mistríkovho vzorca je začlenenie lexikálnej rozmanitosti prítomnej v texte. Pri skúmaní školských učebníc možno pozorovať prítomnosť rôznorodého jazyka, ktorý koreluje s jazykovou zdatnosťou očakávanou od žiakov konkrétnej vekovej skupiny. Avšak tento vzorec má tiež obmedzenie. Hodnotenie nezahŕňa kvantitatívnu analýzu kvalitatívnych aspektov slovnej zásoby a stavby viet v texte. Pri snahe porozumieť danému dokumentu je pre čitateľa kľúčové zvážiť nielen rozsah použitej slovnej zásoby, ale aj kvalitatívne aspekty, ako je prítomnosť a frekvencia odbornej terminológie v texte. [8,31].

1.2 Lingvistické premenné

Prostredníctvom lingvistických premenných vieme po označkovaní textu zvolenou metrikou zložitosti zistiť jednotlivé početnosti slov. To nám môže pomôcť lepšie predikovať, či je zvolený text komplexnejší alebo naopak ľahko pochopiteľný [1]. Existuje niekoľko lingvistických premenných, ich počet sa môže odvíjať na základe stavby samotného jazyka (napríklad slovenčina nerozoznáva determinátory, ktoré sú pre angličtinu typické), najčastejšie si však rozoberieme nižšie [33]:

• Priemerná dĺžka vety – počet slov (Average length of sentence),

• Priemerná dĺžka slova – počet znakov (Average length of words),

• Početnosť dlhých viet (napr. viac ako 10) (Frequency of long sentences)

• Početnosť krátkych viet (napr. menej ako 10) (Frequency of short sentences),

• Početnosť podstatných mien (Frequency of nouns),

• Početnosť prídavných mien (Frequency of ajdectives),

• Početnosť vlastných mien (Frequency of proper nouns),

• Početnosť zámen (Frequency of pronouns),

• Početnosť slovies (Frequency of verbs),

• Početnosť číslovieк (Frequency of numerals),

• Početnosť determinantov (Frequency of determiners),

• Početnosť predložiek (Frequency of particules),

• Početnosť pomocných slovies (Frequency of adpositions),

• Početnosť citosloviec (Frequency of interjections),

• Početnosť koordinačných predložiek (Frequency of coordinating conjuctions),

• Početnosť subkoordinačných predložiek (Frequency of subcoordinating conjuctions),

• Početnosť ostatných POS (Part of Speech) značiek (Frequency of other POS tags),

2 Výsledky a diskusia

Táto kapitola prezentuje výsledky analýzy obťažnosti textu konkrétneho dokumentu – *Individuálna účtovná závierka zostavená v súlade s Medzinárodnými štandardmi finančného výkazníctva v znení prijatom Európskou úniou a Správa nezávislého audítora* od komerčnej banky v slovenskom jazyku. Pomocou Mistríkovej miery zložitosti, ktorá bude predstavovať referenčnú mieru k ostatným zvoleným metrikám, budeme prezentovať zložitosť daného dokumentu. Výsledky sú interpretované a diskutované v kontexte zrozumiteľnosti a prístupnosti textu pre rôzne cieľové skupiny.

2.1 Metodológia

Pred samotným začiatkom výskumu sme sa zamerali na jednotlivé metriky zložitosti, ktoré sa často využívajú pri analýze ekonomických textov. Dôvodom, prečo sme si zvolili dokument z ekonomického prostredia je ten, že tieto dokumenty bývajú častokrát náročné pre širokú verejnosť, a teda samotné dohľadanie si niektorých informácii býva veľakrát náročné. Rozhodli sme sa pre analýzu ako anglickej, tak aj slovenskej verzie tejto ekonomickej správy, nakoľko sme chceli sledovať vyhodnotenie anglickej správy Mistríkovým vzorcom obťažnosti, keďže z analýzy sme zistili, že tento je vytvorený pre slovenský jazyk. Taktiež sme sa rozhodli pre analýzu slovenského ekvivalentu

ostatnými popisovanými mierami, ktoré boli prevažne tvorené pre anglické texty.

Chceme teda zistiť či nastane podobnosť vyhodnotenia metrikami týchto ekonomických správ v iných jazykoch.

Podrobne sme preskúmali zvolený dokument a následne sme si ho pripravili pre manipuláciu s ním – prekonvertovali sme ho do textového súboru, očistili sme si ho od prebytočných medzier, nerozoznateľných znakov, nadbytočných pomlčiek, ktoré reprezentovali tabuľku. Dokument v slovenskom jazyku **obsahuje 20234 slov** a **priemerná dĺžka vety má 26,19 slova.** Dokument v anglickom jazyku **obsahuje 25835 slov** a **priemerná dĺžka vety má 24,03 slova.**

Ďalším krokom bolo vytvorenie vzorca Mistríkovho vzorca obťažnosti, keďže dosiaľ neexistuje knižnica ani nič podobné, čím by sme aplikovali danú metriku na dokumenty. Výskum sme sa rozhodili realizovať v programovacom prostredí Python, keďže je známy svojou využiteľnosťou v oblasti dátovej vedy a ľahšou manipuláciou. Na vytvorenie samotného algoritmu sme použili článok od samotného Mistríka [27], keďže je to pôvodný autorský opis metriky. Na Obrázku 1 je popísaný pseudokód fungovania kódu:

1. Rozdelíme text na slová a vety.
2. Vypočítame priemernú dĺžku vety (V):
   - V = súčet dĺžok viet / počet viet
3. Vypočítame priemernú dĺžku slov vyjadrenú počtom slabík (S):
   - S = počet slabík / počet slov
   - Prechádzame cyklom pole slov aby sme zistili počet slabík v slove:
     - Ak má slovo 2 alebo menej znakov, je to jedna slabika
     - Inak spočítame počet samohlások v slove.
     - Odpočítame počet dvojhlások v slove.
     - Ak je počet slabík > 0, pridáme ho k celkovému počtu slabík.
     - Inak pridajte k celkovému počtu slabík 1
4. Vypočítame index opakovania slov (I):
   - I = počet slov / počet unikátnych slov
5. Vypočítame Mistríkov index čitateľnosti (R):
   - R = 50 - ((V * S) / I)

Obrázok 1 Pseudokód Mistríkovho vzorca zložitosti

Pri programovaní metriky sme sa predovšetkým museli zamerať na správne určenie slabík, keďže vo vzorci sa používa premenná, ktorá vyjadruje priemernú dĺžku viet podľa počtu slov, vyjadrenú počtom slabík. To znamená, že Mistrík sa zameral na to, koľko slabičné slová sa vo vete nachádzajú. Taktiež je pre metriku podstatné opakovanie slov – Index opakovania slov má vplyv na zložitosť textu. Častejšie opakovanie slov znižuje jeho obťažnosť. Hodnota zrozumiteľnosti textu (R) sa porovnáva so škálou, kde texty s najnižšou obťažnosťou majú hodnoty od 40 – do 50 bodov a texty s najvyššou obťažnosťou (na hranici zrozumiteľnosti) majú 0 – 10 bodov [29]. Pre ladenie vzorca sme si vzali ako vzor umelecké texty a náučno-vedecké texty, ktoré použil aj sám Mistrík vo svojej práci [27], ktoré sme vyhodnocovali podľa vyššie spomenutých hodnôt.

2.2 Výsledky

Po doladení vzorca (dolaďovanie zahŕňalo napríklad prevod všetkých písmen na malé písmená, aby sme zabezpečili správnu početnosť opakovania slov) sme následne ako prvý otestovali dokument v slovenskom jazyku. Výsledok merania zrozumiteľnosti bol vyhodnotený na hodnotu 31,02 – to znamená, že dokument nemá najnižšiu obťažnosť, no zároveň je hodnotený ako stredne obťažný. Rovnako to potvrdili ostatné metriky, ktoré sme získali prostredníctvom knižnice *py-readability-metrics.*

Prvou použitou metrikou bola Flesch-Kincaid Grade Level, ktorá dosiahla skóre 20,87. Zaokrúhlená hodnota vyšla na 21, čo znamená, že text je určený pre vysokoškolsky vzdelaných čitateľov.

Ďalšou metrikou bola Flesch Reading Ease, ktorej skóre určilo na -2,25 zaokrúhlene, čo metrika vyhodnotila ako *„very confusing“* a taktiež stanovila, že dokument je určený pre čitateľov s vysokoškolským vzdelaním, priam až profesionálov, keďže text bol vyhodnotený ako extrémne ťažko čitateľný.

Ako tretí v poradí sme použili SMOG Index, pri ktorom nám ale knižnica dala na výber – Pôvodný vzorec SMOG používa ukážku 30 viet z pôvodného textu. Vzorec však možno zovšeobecniť na ľubovoľný počet viet. Aplikovali sme však obe možnosti – pri možnosti, kde sme si vybrali iba 30 viet z dokumentu, nám index vyšiel na 26, čo znamená, že sa nám opäť potvrdilo, že dokument je vhodný pre vysokoškolského absolventa. Pri možnosti, kde sme vybrali všetky vety, sa skóre rovnalo hodnote 21, čo opäť určilo, že text je vhodný pre vysokoškolského absolventa.

Metrika Gunning Fog Index bola ďalšou v poradí. Hodnota metriky vyšla na 23,90 zaokrúhlene, čo nám ukázalo opäť, že text je vhodný pre vysokoškolsky vzdelaného absolventa.

Poslednou metrikou, ktorú sme aplikovali na dokument je metrika Automated Readability Index. Táto metrika je vo svojom opise obsiahlejšia, preto nám vyšli 3 hodnoty – skóre metriky vyšlo 24,09 zaokrúhlene, čo pri tejto metrike znamená, že text je vhodný pre absolventov vysokej školy a profesionálov v odbore – samotný text je ťažký na čítanie.

Ako druhý sme testovali dokument v anglickom jazyku, pretože môže sa zdať, ostatné metriky okrem Mistríkovej, by mohli dokument v slovenskom jazyku považovať za obťažný práve z dôvodu, že samotná

slovenčina je radená medzi vysoko flektívne jazyky a tým pádom nie sú stavané na takýto typ jazyka.

Po meraní čitateľnosti v slovenskej verzii testovaného dokumentu, sme prešli na meranie čitateľnosti anglickej verzie. V tomto prípade nám vyšiel zaujímavý výsledok – hoci Mistríkova miera obťažnosti dosiahla hodnotu 43,91 bodov, čo znamená, že text je ľahko zrozumiteľný, ostatné metriky, ktoré sú zamerané na anglické texty, namerali veľmi podobné skóre ako pri slovenskej verzii dokumentu. Poradie použitia metrík bolo totožné ako pri testovaní slovenskej verzie dokumentu. Pre Flesch-Kincaid Grade Level dosiahlo skóre zložitosti hodnotu 17, čo znamená, že text je určený pre čitateľov, ktorí absolvovali štúdium vysokej školy.

Flesch Reading-Ease dosiahlo skóre 21,19 zaokrúhlene, čo znamená, že text je veľmi ťažko čitateľný, určený pre vysokoškolských absolventov.

SMOG Index nám pri možnosti, kde sme si vybrali iba 30 viet z dokumentu, nám skóre vyšlo na 27, čo opäť potvrdilo, že text je ťažko čitateľný a je vhodný pre vysokoškolského absolventa. Pri možnosti, kde sme vybrali všetky vety, sa skóre rovnalo hodnote 19, čo nám znovu potvrdilo, že text je podľa tejto metriky vhodný pre vysokoškolského absolventa.

Metrika Gunning Fog Index nám namerala skóre čitateľnosti na 20,25 zaokrúhlene, čo nám opäť signalizuje zaradenie dokumentu medzi ťažšiu čitateľnosť, vhodnú pre vysokoškolských absolventov.

Nakoniec sme použili metriku ARI, ktorej index zložitosti vyšiel na 18,47 zaokrúhlene, čo pri tejto metrike znamená, že text je vhodný pre absolventov vysokej školy a profesionálov v odbore. Výsledky, ktoré sme si opísali sú prehľadne zobrazené aj v Tabuľke 6 nižšie:

Tabuľka 6 Výsledná porovnávacia tabuľka metrík pre slovenský a anglický dokument

Metriky	SK dokument	EN dokument
Mistríkova miera komplexity	31,02	43,91
Flesch-Kincaid Grade Level	20,88	17,14
Flesch Reading Ease	0	21,19
Gunning Fog Index	23,9	20,25
SMOG Index - 30 viet	26,36	27,39
SMOG Index - všetky vety	21,13	19,25
ARI Index	24,09	18,47

Aj podľa vyššie uvedenej Tabuľky 6 sme mohli konštatovať, že Mistríkova miera zložitosti nie je vhodná pre anglický text, čo môžeme odôvodniť tak, že ako sme si spomínali v teoretickej analýze, Mistríkov vzorec obťažnosti sa zameriava na priemernom počte opakovania slov vo vete. Anglický jazyk sa považuje za nízko flektívny jazyk, čo sa môže odzrkadliť práve na tom opakovaní slov. Slovenský jazyk je hodnotený ako vysoko flektívny jazyk, preto táto metrika sa zamerala na výskyt jedinečných slov, ktoré nám určujú, ako je text komplexný.

Z Tabuľky 6 sme si mohli tiež všimnúť, že niektoré metriky zareagovali skoro totožne na komplexitu textu, bez ohľadu na jazyk textu, pričom máme znalosť, zvyšné metriky sú primárne vyvinuté pre anglický jazyk. Okrem metriky Flesch Reading Ease, kde síce sú oba texty určené v rovnakom rozmedzí obťažnosti, no číselné rozpätie je veľké. Čo však stojí za povšimnutie je číselné ohodnotenie pôvodného SMOG Indexu, kde rozdiel ohodnotenia zložitosti textov predstavoval iba o hodnotu 1,03, čo môžeme povedať za zanedbateľný rozdiel. Ďalšou metrikou, ktorej rozdiel bol malý, bol Gunning Fog Index, kde konkrétny rozdiel predstavoval hodnotu 3,65.

Celkovo sme však mohli usúdiť na základe porovnania hodnotenia textov metrikami, že oba boli vyhodnotené ako veľmi komplexné, vhodné predovšetkým pre takých čitateľov, ktorí majú ukončené vysokoškolské vzdelanie a sú takpovediac odborníkmi v danom odvetví.

Záver

Vo výskume sme sa zamerali na analýzu čitateľnosti ekonomického textu v slovenskom a anglickom jazyku. Cieľom bolo porovnať výsledky merania rôznych metrík čitateľnosti a zistiť, či existuje zhoda v hodnotení zložitosti textu v závislosti od jazyka. Analýza ukázala, že Mistríkova miera zložitosti nie je vhodná pre anglický text, pretože sa zameriava na priemerný počet opakovania slov vo vete, čo je pre nízko flektívny anglický jazyk menej relevantné. Ostatné metriky, primárne vyvinuté pre anglický jazyk, vyhodnotili oba texty ako veľmi komplexné, vhodné pre vysokoškolsky vzdelaných čitateľov a odborníkov v danom odvetví. Niektoré metriky, ako napríklad pôvodný SMOG Index a Gunning Fog Index, zareagovali na komplexitu textu takmer identicky bez ohľadu na jazyk. Rozdiely v hodnotení zložitosti medzi slovenským a anglickým textom boli v niektorých prípadoch zanedbateľné (SMOG Index) alebo mierne (Gunning Fog Index).

Výsledky našej práce naznačujú, že pri hodnotení čitateľnosti ekonomických textov je dôležité zvoliť vhodné metriky s ohľadom na jazyk textu. Podľa výsledkov môžeme konštatovať, že niektoré metriky môžu byť univerzálnejšie a dokážu zachytiť zložitosť textu bez ohľadu na jazyk, zatiaľ čo iné sú jazykovo špecifické.

V budúcnosti chceme skúmať viac ekonomických textov, špeciálne povinne zverejňované informácie komerčnými bankami a zistiť či návštevnosť povinne zverejňovaných informácií (pomocou Web Usage Mining, Google Analytics, atď.), resp. ich popularita (z hľadiska vyhľadávačov, Google Trends, a pod.) závisí od jazykovej zložitosti dokumentov – to znamená, že budeme analyzovať návštevnosť a popularitu povinne zverejňovaných informácií v závislosti od ich zložitosti. Na základe cieľa potrebné zistiť, či sú informácie prezentované v jasnom, jednoduchom a zrozumiteľnom jazyku alebo či obsahujú vysokú mieru jazykovej zložitosti, ktorá môže potencionálne znižovať záujem o tieto informácie. Dokumenty je vhodné skúmať viacerými metrikami, ktoré vieme nasledovne štatisticky vyhodnotiť - napríklad, či sú štatisticky významné a prínosné pre slovenský jazyk.

Použitá literatúra

[1] GAVORA, P., a kol. 2008. Ako rozvíjať porozumenie textu u žiaka. Nitra: Enigma, 193s. ISBN 978-80-89132-57-7.

[2] PRŮCHA, J. 1984. Hodnocení obtížnosti učebnic. Struktury a parametry učiva. Praha: SNTL.

[3] BREČKA, Samuel. 2003. Teória a dejiny masovej komunikácie: Učebný text [online]. [cit. 2024-01-26]. Dostupné z: http://www.net/fmk.zimny-2003.htm

[4] CALDERÓN, José L., Leo S. MORALES, Honghu LIU a Ron D. HAYS, 2006. Variation in the Readability of Items Within Surveys. American Journal of Medical Quality [online]. 2006, roč. 21, č. 1, s. 49–56. Dostupné na: doi:https://doi.org/10.1177/1062860605283572

[5] KOUAMÉ,B. J.,(2010) Using Readability Tests to Improve the Accuracy of Evaluation Documents Intended for Low-Literate Participants. In: Journal of MultiDisciplinary Evaluation, 14(6), 132-139. Dostupné na: ISSN 1556-8180.

[6] GAVORA, P. 1999b. Úvod do pedagogického výskumu. 2. vyd., Bratislava : Univerzita Komenského, 236 s. ISBN 80-223-1342-4.

[7] TILLMAN, R., HAGBERG, L. 2014. Readability algorithms compability on multiple languages.2014

[8] ŽOLDOŠOVÁ, .K. 2008. Metódy analýzy textov, [online]. [cit. 2024-01-26]. Dostupné na internete: <http://pdfweb.truni.sk/fak/katedry/kpaep/studenti/studijne_materialy/zoldosova/MPV_ studtext.doc>

[9] PELÁNEK, R., EFFENBERGER, T. and ČECHÁK, J. 2022. Complexity and difficulty of items in learning systems. In: International Journal of Artificial Intelligence in Education, Springer. v.32, n.1, pp.196–232

[10] FLESCH, Rudolph, 1948. A New Readability yardstick. Journal of Applied Psychology [online]. 1948, roč. 32, č. 3, s. 221–233. Dostupné na: doi:https://doi.org/10.1037/h0057532

[11] KINCAID, J. P, FISHBURNE, R. P. Jr., ROGERS, R. L.; & CHISSOM, B. S. 1975. "Derivation Of New Readability Formulas (Automated Readability Index, Fog Count And Flesch Reading Ease Formula) For Navy Enlisted Personnel" Institute for Simulation and Training. 56.

[12] FLESCH, R., 1979. How to Write Plain English. B.m.: HarperCollins Publishers.

[13] READABLE, 2023. Flesch Reading Ease and the Flesch Kincaid Grade Level. Readable [online] [cit. 2024-01-26]. Dostupné na:https://readable.com/readability/flesch-reading-ease-flesch-kincaid-grade-level/

[14] REDISH, J., 2000. Readability Formulas Have Even More Limitations than Klare Discusses. ACM Journal of Computer Documentation [online]. 2000, roč. 24, č. 3, s. 132–137. Dostupné na: doi:https://doi.org/10.1145/344599.344637

[15] LOUGHRAN, T & MCDONALD, B. 2011. Measuring Readability in Financial Disclosures. SSRN Electronic Journal [online]. 2011 [cit. 2024-01-26]. Dostupné na: doi:https://doi.org/10.2139/ssrn.1920411

[16] HASSAN, M. K., ABU-ABBAS, B., KAMEL, H. T. 2022. Readability and financial risk: the case of GCC banks. In: Journal of Accounting in Emerging Economies, vol. 12, roč.4: 716-740.

[17] GUNNING, R. 1952. The Technique of Clear Writing. McGraw-Hill, New York. - References - Scientific Research Publishing. [online] [cit.2024-01-26].Dostupné na:

https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers?ReferenceID=2056050

[18] BOGERT, J., 1985. In Defense of the Fog Index. The Bulletin of the Association for Business Communication [online]. 1985, roč. 48, č. 2, s. 9–12. Dostupné na: doi:https://doi.org/10.1177/108056998504800203

[19] WRIGLEY KELLY, N. E.,. MURRAY, K. E, MCCARTH C., & O'SHEA D. B., 2021. An objective analysis of quality and readability of online information on COVID-19. Health and Technology [online]. 2021, roč. 5, č. 11. Dostupné na: doi:https://doi.org/10.1007/s12553-021-00574-2

[20] MC LAUGHLIN, G. H. 1969. SMOG Grading-a New Readability Formula. In: Journal of Reading, roč.,12,č.8,s. 639–646. Dostupné na: http://www.jstor.org/stable/40011226

[21] FITZSIMMONS, PR, BD MICHAEL, JL HULLEY a GO SCOTT, 2010. A readability assessment of online Parkinson's disease information. The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh [online]. 2010, roč. 40, č. 4, s. 292–296. Dostupné na: doi:https://doi.org/10.4997/jrcpe.2010.401

[22] HEDMAN, A., S., 2008. Using the SMOG Formula to Revise a Health-Related Document. American Journal of Health Education [online]. 2008, roč. 39, č. 1, s. 61–64. Dostupné na: doi: https://doi.org/10.1080/19325037.2008.10599016

[23] COURTIS, J. K., 1987. Fry, Smog, Lix and Rix: Insinuations about Corporate Business Communications. Journal of Business Communication [online]. 1987, roč. 24, č. 2, s. 19–27 Dostupné na: doi:https://doi.org/10.1177/002194368702400202

[24] DERGUECH, W., ZAINAB S.S, & D'AQUIN M. 2018. Assessing the Readability of Policy Documents. Proceedings of the 11th International Conference on Theory and Practice of Electronic Governance [online]. 2018. Dostupné na: doi:https://doi.org/10.1145/3209415.3209498

[25] Senter, R.J.; Smith, E.A. 1967. "Automated Readability Index" In: Amrl-Tr. Aerospace Medical Research Laboratories (U.s.). Wright-Patterson Air Force Base: 1–14.

[26] DRAHOŠOVÁ, R. 2014. Hodnotenie zrozumiteľnosti textu učebnice: Diplomová práca. Brno: Masarykova univerzita, Pedagogická fakulta, 76s. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/bsmyn/.

[27] MISTRÍK, J. 1968. Meranie zrozumiteľnosti prehovoru. In Slovenská reč 3. s. 171-178. ISSN 0037-6981.

[28] MISTRÍK, J. 1996. Efektívne čítanie. Bratislava: Veda, 117s. ISBN 80-224-0454-3

[29] PRŮCHA, J. Učebnice: teorie a analýzy edukačního média. Brno: Paido,1998. 148 s. ISBN 80-85931-49-4

[30] KARABIBER, Fatih, 2024. Cosine Similarity. www.learndatasci.com [online] [cit.2024-01-26]. Dostupné na: https://www.learndatasci.com/glossary/cosine-similarity/

[31] GARABÍK, R. 2022. Lineárny model dynamických trendov v používanej slovnej zásobe a jeho použitie na detekciu kvantitatívnych zmien lexiky v (takmer) reálnom čase = A linear model of dynamic trends in the used lexicon and its application for the detection of quantitative lexical changes in (almost) real time. In: Jazyková zmena a pramene jej skúmania. Bratislava: Univerzita Komenského, s. 223-244. ISBN 978-80-223-5118-8

Vliv různých způsobů extrakce na antioxidační a antimikrobiální vlastnosti extraktu tužebníku jilmového

Impact of different extraction methods on the antioxidant and antimicrobial properties of *Filipendula ulmaria* extract

Matěj Rychetský[1]
Školitel: Eva Vítová[1]
[1]Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno
matej.rychetsky@fch.vut.cz, vitova@fch.vut.cz

Abstrakt

Léčivé rostliny a extrakty z nich mohou sloužit jako přírodní zdroj zdraví prospěšných látek. Jednou z rostlin, která tyto látky poskytuje, je tužebník jilmový *(Filipendula ulmaria)* u něhož byly prokázány potenciální antioxidační, antimikrobiální a protizánětlivé účinky.

Předložená práce se zabývá zkoumáním vlivu různých způsobů extrakce na antioxidační a antimikrobiální účinky získaných extraktů, neboť obsah aktivních látek se v závislosti na použitém způsobu extrakce značně liší. Bylo porovnáno několik druhů extrakce – macerace, extrakce v ultrazvukové lázni a parní destilace. Zároveň byl sledován vliv dalších parametrů ovlivňujících účinnost extrakce – použité rozpouštědlo, teplota a doba extrakce a poměr navážky vůči rozpouštědlu.

Antioxidační aktivita byla měřena pomocí TEAC a DPPH testů, celkový obsah fenolických látek byl stanoven s využitím Folin-Ciocalteuova činidla a antimikrobiální aktivita byla testována agarovou difůzní metodou proti třem mikroorganismům – gramnegativní bakterii *Escherichia coli*, grampozitivní bakterii *Bacillus cereus* a kvasince *Candida glabrata*.

Na základě výsledků všech analýz byla jako nejvhodnější pro získání extraktu s ideálním složením z hlediska antioxidační aktivity vybrána extrakce v ultrazvukové lázni za následujících podmínek: 40% ethanol v poměru navážka:rozpouštědlo 1:5, 60 °C po dobu 90 min.

Klíčová slova: tužebník jilmový, extrakce, antioxidační aktivita, antimikrobiální aktivita

Abstract

Medicinal plants and their extracts can serve as a natural source of health beneficial substances. One of the plants that can provide these substances is *Filipendula ulmaria*, which has shown potential antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory effects.

The present work examined the effect of different extraction methods on the antioxidant and antimicrobial effects of the obtained extracts, as the content of active compounds varies significantly depending on the extraction method used. Several extraction methods were compared – maceration, ultrasonic assisted extraction and steam distillation. At the same time, the influence of other parameters affecting the extraction efficiency - the solvent used, the temperature and time of extraction, and the solid:solvent ratio - was investigated.

Antioxidant activity was measured using TEAC and DPPH assays, total phenolic content was determined using Folin-Ciocalteu reagent and antimicrobial activity was tested by agar diffusion method against three microorganisms – gram-negative *Escherichia coli*, gram-positive *Bacillus cereus* and *Candida glabrata* yeast.

Based on the results of all analyses, ultrasonic extraction was selected as the most suitable method to obtain an extract with an ideal composition in terms of antioxidant and antimicrobial activity under the following conditions: 40% ethanol in a solid:solvent ratio of 1:5, extraction time of 90 minutes at 60 °C.

Keywords: *Filipendula ulmaria*, extraction, antioxidant activity, antimicrobial activity

Úvod

Tužebník jilmový (*Filipendula ulmaria*) je rostlina známá pro své léčivé vlastnosti a dlouhou historii použití v tradiční medicíně. Tato bylina roste zejména v Evropě a Asii. Obsahuje mnoho bioaktivních látek, včetně fenolických kyselin, flavonoidů a tříslovin [4], které jsou zodpovědné za její farmakologické účinky.

Jednou z hlavních vlastností tužebníku jilmového je jeho významný antioxidační potenciál. Antioxidanty pomáhají chránit buňky před škodlivými účinky volných radikálů a přispívají k udržení celkového zdraví [1-3]. Studie ukazují, že extrakty z tužebníku vykazují vysokou antioxidační účinnost zejména díky obsahu fenolických sloučenin, mezi jejichž nejvíce se vyskytující zástupce v tužebníku patří zejména polyfenoly, flavonoidy, katechiny a proanthokyany [4-7]. Zároveň byl také díky obsahu flavonoidů a salicylátů prokázán protizánětlivý potenciál tužebníku a jeho extraktu [8].

Další významnou vlastností tužebníku jilmového je jeho potenciální antimikrobiální účinek. Různé výzkumy naznačují, že extrakty z této rostliny mohou inhibovat růst a šíření určitých mikroorganismů, včetně bakterií a hub [9,10]. Díky tomu se otevírá možnost využití extraktů z tužebníku jako přírodního léku nebo jako přísady v kosmetických a farmaceutických produktech [11]. Zároveň se díky příjemné, lehce nasládlé chuti tužebníku začíná využívat jeho extraktů jakožto přírodních aditiv do potravinářských výrobků, kde nejen zlepšují jejich nutriční vlastnosti, ale zároveň mají i pozitivní vliv na jejich chuť a vůni [12,13].

Na množství aktivních látek, které se povede z rostlinných materiálů získat, má klíčový vliv použitá extrakční technika [14-16]. Mezi nejčastěji používané extrakční metody patří macerace, ultrazvuková extrakce a parní destilace [17].

Macerace je tradiční metoda, která zahrnuje namáčení rostlinného materiálu v rozpouštědle za účelem extrakce žádoucích látek [17]. Ultrazvuková extrakce využívá ultrazvukové vlny k rozbití buněčných stěn rostlinného materiálu, což má za následek urychlení procesu a zvýšení účinnosti extrakce [18,19]. Pro získávání esenciálních olejů se také velmi často využívá parní destilace, neboť se jedná o metodu, která umožňuje extrakci látek, které jsou citlivé na vyšší teploty [20] a zároveň snižuje ztrátu polárních sloučenin během extrakce [21], což jsou obvykle právě látky, které vykazují aktivní účinky.

Cílem práce bylo prozkoumat vliv různých způsobů extrakce a dalších extrakčních parametrů na antioxidační a antimikrobiální potenciál extraktu tužebníku jilmového.

1 Materiál a metody

V této části si popíšeme použitý materiál a příslušející metody, které jsme potřebovali při výzkumu.

1.1 Materiál

Kyselina gallová, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina (TROLOX), ABTS, 2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), uhličitan sodný v analytické čistotě (Glenthman, Německo), 96% ethanol, hexan v HPLC čistotě, kyselina fosforečná, hydroxid sodný v analytické čistotě (Lachner, Česká republika), sušená nať tužebníku jilmového (Salvia Paradise, Česká republika).

1.2 Příprava vzorku a jeho extrakce

Sušená nať tužebníku byla rozdrcena v elektrickém mlýnku na jemný prášek, smíchána se zvoleným rozpouštědlem v požadovaném poměru a extrahována. V případě macerace a extrakce v ultrazvukové lázni byly vzorky připravovány ve skleněných lahvích s uzávěrem, v případě destilace s vodní parou bylo využito přístroje VAPODEST® (Gerhardt, Německo). Po ukončení extrakce byly extrakty za sníženého tlaku přefiltrovány přes Büchnerovu nálevku a zahuštěny na vakuové rotační odparce při teplotě 50 °C. Takto připravené extrakty byly zamraženy a připraveny k analýze.

1.3 Měření antioxidační aktivity

Toto měření bylo sestaveno z několika metod:

Sestrojení kalibrační křivky pro TEAC a DPPH měření

Pro sestrojení kalibrační závislosti byla připravena kalibrační řada zředěním standardního zásobního roztoku Troloxu 60% ethanolem k dosažení rozmezí koncentrací přibližně 50 – 400 $mg \cdot ml^{-1}$. Jako slepý vzorek byl použit ethanol. Absorbance byla měřena při $\lambda = 734$ nm proti slepému vzorku.

Metoda TEAC

Nejdříve byl připraven roztok $ABTS^{\bullet+}$ o koncentraci 7 $mmol \cdot l^{-1}$ rozpuštěním ABTS ve vodě, k němuž bylo následně přidáno 2,45 $mmol \cdot l^{-1}$ $K_2S_2O_8$. Takto připravený roztok byl ponechán 16 hodin v temnu a dále byl uchováván zabalený v alobalu v lednici. Před měřením byl roztok $ABTS^{\bullet+}$ naředěn 60% ethanolem na absorbanci $A = 0{,}700 \pm 0{,}02$ a měření probíhalo při vlnové délce $\lambda = 734$ nm proti ethanolu. Do zúžené kyvety byl napipetován 1 ml naředěného roztoku $ABTS^{\bullet+}$ a 10 µl destilované vody a byla změřena absorbance (A_0). Do další kyvety bylo k upravenému vzorku $ABTS^{\bullet+}$ přidáno 10 µl 20x zředěného vzorku a byla sledována změna absorbance v časovém intervalu 10 minut (A_1). Během měření byly vzorky i roztoky vždy uchovávány v temnu. Výsledná absorbance byla

vypočtena pomocí vzorce: $A = A_0 - A_1$ a antioxidační aktivita byla vyjádřena jako parametr TEAC, tj. jako koncentrace Troloxu odpovídající antioxidační aktivitě vzorku v $mg \cdot ml^{-1}$.

Metoda DPPH

Do zkumavek bylo pipetováno 3,25 ml methanolického roztoku volného radikálu DPPH, 1,25 ml fosfátového tlumivého roztoku o pH = 7,00 a 0,5 ml 20x zředěného vzorku. Odměrné baňky byly promíchány a inkubovány 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí požadované doby inkubace byly jednotlivé vzorky proměřeny v křemenných kyvetách při konstantní vlnové délce 519 nm proti slepému pokusu (srovnávací kyveta obsahovala 2 ml methanolu a 1 ml fosfátového tlumivého roztoku).

1.3 Měření celkového obsahu polyfenolů (TPC)

Toto měření bylo sestaveno z několika metod:

Sestrojení kalibrační křivky

Pro sestrojení kalibrační křivky kyseliny gallové byly připraveny kalibrační roztoky o koncentraci 100 – 700 $mg \cdot ml^{-1}$. Absorbance byla měřena při λ = 750 nm proti slepému vzorku, výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent GAE (Gallic Acid Equivalent), tj. mg kyseliny galové na 1 ml vzorku.

Folin-Ciocalteauova metoda

Nejprve byl připraven pracovní roztok Folin-Ciocaltaeuova činidla zředěním vodou v poměru 1:9 a nasycený roztok Na_2CO_3 smícháním přibližně 7,5 g v 95 ml vody. Do zkumavek bylo přidáno 100 µl vzorku, 1 ml vody a 1 ml zředěného Folin-Ciocaltaeuova činidla. Po promíchání se nechaly vzorky 5 minut stát a následně byl přidán 1 ml roztoku uhličitanu sodného. Vzorky byly poté promíchány a ponechány stát 45 minut ve tmě (paralelně byl namíchán i slepý vzorek, který místo vzorku obsahoval 100 µl destilované vody). Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při vlnové délce λ = 750 nm proti slepému vzorku.

1.3 Antimikrobiální analýza

Zaočkování bujónů

Testovací mikroorganismy byly nejprve namnoženy v tekutém živném médiu. Na zaočkování *B. cereus* a *E. coli* byl použit masopeptonový bujón. Bujón byl připraven dle návodu navážením 25 g přípravku a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody. Pro zaočkování kvasinky *C. glabrata* byl použit sladinový bujón navážením 19,2 g přípravku na 1000 ml destilované vody. Oba bujóny byly následně vysterilizovány při teplotě 121 °C po dobu 20 minut a rozpipetovány po 5 ml do zkumavek. Pouze pro *E. coli* byl odpipetován bujón o objemu 50 ml. *B. cereus* a *C. glabrata* byly přeočkovány z šikmého agaru do zkumavek s připraveným bujónem. 50 ml bujónu bylo *E. coli* zaočkováno pomocí oživení kultury z želatinového disku. Vyžíhanou kličkou byl z lahvičky přenesen želatinový disk do bujónu. Bujóny byly inkubovány při 25 °C (*B. cereus, C. glabrata*) a 37 °C (*E. coli*) po dobu 24 hod.

Příprava kultivačního média

Na přípravu kultivačního média pro bakterie byl použit masopeptonový agar (Nutrient Agar No. 2, HIMEDIA). Živné médium bylo připraveno dle návodu navážením 40 g do 1000 ml destilované vody. Médium bylo vysterilizováno při 121 °C po dobu 20 minut. Vysterilizované médium mělo pH 7,2 ± 0,2 při 25 °C. Pro kvasinku byl použit sladinový agar (Malt Extract Agar Base, HIMEDIA). Živné médium bylo připraveno dle návodu navážením 50 g do 1000 ml destilované vody. Médium bylo vysterilizováno při 121 °C po dobu 20 minut. Vysterilizované médium mělo pH 5,4 ± 0,2 při 25 °C.

Stanovení antimikrobiální aktivity

Do 150 ml vysterilizovaného zchlazeného kultivačního média bylo napipetováno 1,5 ml bujónu obsahujícího 24hodinovou kulturu daného mikroorganismu. Naočkované živné médium (inokulum) bylo rozlito do Petriho misek a ponecháno k zatuhnutí. V případě fakultativně anaerobní *E. coli* byl zatuhnutý agar ještě přelit čistým živným médiem a opět ponechán k zatuhnutí. Po zatuhnutí bylo do agaru pomocí korkovrtu uděláno 7 jamek o průměru 0,5 cm. Do 6 jamek byl pipetován připravený extrakt a do kontrolní jamky bylo napipetováno rozpouštědlo použité pro přípravu extraktu. Misky byly kultivovány při 25 °C (*B. cereus, C. glabrata*) a při 37 °C (*E. coli*) po dobu 72 hodin. Následně byly změřeny průměry vzniklých inhibičních zón.

Statistické zpracování

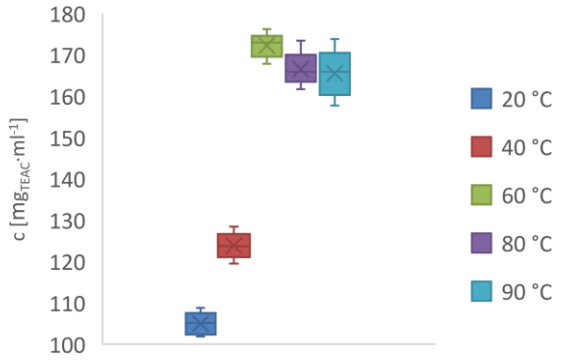
Data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu MS Excel 2023 a softwaru Statistica 14. Všechny analýzy byly provedeny na hladině významnosti α = 0,05. Pro statistické vyhodnocení byla použita parametrická analýza rozptylu ANOVA (normální distribuce dat) a neparametrická analýza rozptylu ANOVA (Kruskal-Wallis test) (nenormální distribuce dat) s využitím

dalších statistických testů (např. Shappiro-Wilkův, Grubssův, Brown-Forsytheho).

2 Výsledky a diskuze

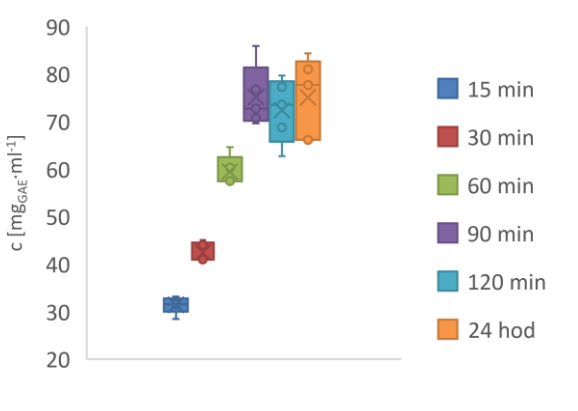
Podstatou prováděných experimentů bylo optimalizovat proces získávání extraktu z rostliny *Filipendula ulmaria* a zároveň prozkoumat její antioxidační a antimikrobiální potenciál. Pro efektivní využití času, zdrojů a sledování vlivu více faktorů najednou bylo k provádění experimentů využito metody DOE (design of experiments). Zároveň jsme ale byli schopni pozorovat vliv jednotlivých extrakčních parametrů na účinnost extrakce.

Graf na obrázku 1 ukazuje vliv rozdílné teploty extrakce na antioxidační aktivitu měřenou pomocí metody TEAC (při měření pomocí metody DPPH a celkového obsahu polyfenolů byl trend zcela totožný). Z grafu je patrné, a potvrzuje to i statistické zpracování, že v rozmezí teplot 20 až 60 °C se účinnost zvyšuje ($p = 0{,}0168$; $p<\alpha$) a dále v rozmezí 60 až 90 °C se účinnost již nezvyšuje ($p = 0{,}249$; $p>\alpha$). Jako optimální byla tedy zvolena teplota 60 °C, při které se antioxidační účinnost pohybovala v rozmezí 172,20 ± 2,74 $mg_{TEAC}\cdot ml^{-1}$. V případě metody DPPH se antioxidační aktivita pohybovala v rozmezí 131,45 ± 9,81 $mg_{TEAC}\cdot ml^{-1}$ a celkový obsah polyfenolů byl 68,88 ± 1,09 $mg_{GAE}\cdot ml^{-1}$.



Obrázek 1 Graf závislosti antioxidační aktivity (TEAC) na teplotě

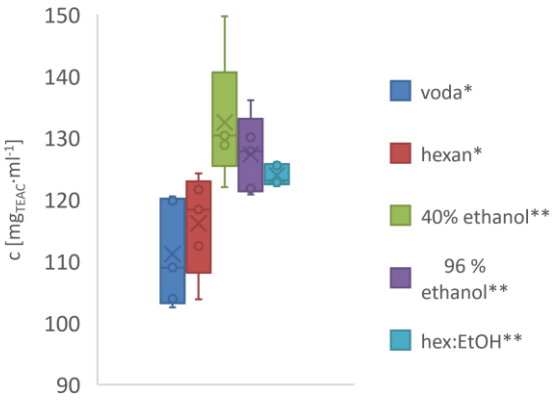
Stejný trend jako v případě vlivu teploty, platil i v případě délky extrakce. Z grafu na obrázku 2 je patrné, že přímá úměra mezi délkou a celkovým obsahem polyfenolů platí v rozmezí časů 15 až 90 minut. Při extrakci trvající 90 minut byl naměřeno TPC = 75,12 ± 5,91 $mg_{GAE}\cdot ml^{-1}$ a antioxidační aktivita byla 170,39 ± 2,65 $mg_{TEAC}\cdot ml^{-1}$ u TEAC a 124,67 ± 10,73 $mg_{TEAC}\cdot ml^{-1}$ u DPPH. Při extrakci delší než 90 minut se



již její účinnost nezvyšovala ($p = 0{,}316$; $p>\alpha$).

Obrázek 2 Graf závislosti obsahu polyfenolů na délce extrakce

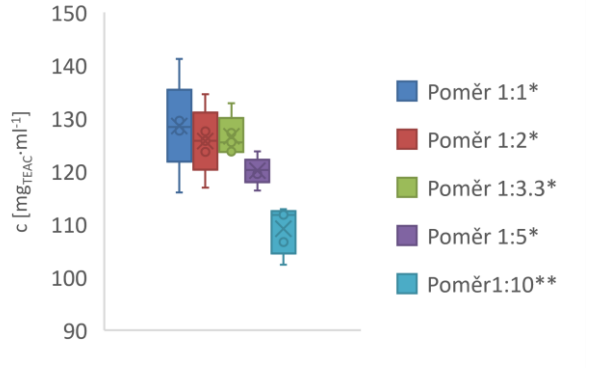
Při porovnání vlivu různých extrakčních činidel bylo prokázáno, že činidla lze rozdělit do dvou skupin z hlediska jejich účinnosti. Ethanol v obou použitých koncentracích a směs ethanolu a hexanu v poměru 1:1 vykazovala statisticky významně vyšší účinnosti, než voda a hexan ($p = 0{,}396$; $p>\alpha$). Tento fakt je znázorněn v grafu na obrázku 3. Ze tří činidel s nejvyšší účinnosti byl nakonec z ekonomických důvodů zvolen jako optimální 40% ethanol, u nějž se antioxidační aktivita pohybovala v rozmezí 173,52 ± 2,56 $mg_{TEAC}\cdot ml^{-1}$ u TEAC, respektive 132,47 ± 9,21 $mg_{TEAC}\cdot ml^{-1}$ u DPPH. Celkový obsah polyfenolů byl poté 69,41 ± 1,03 $mg_{GAE}\cdot ml^{-1}$.



Obrázek 3 Graf závislosti antioxidační aktivity (DPPH) na použitém rozpouštědle

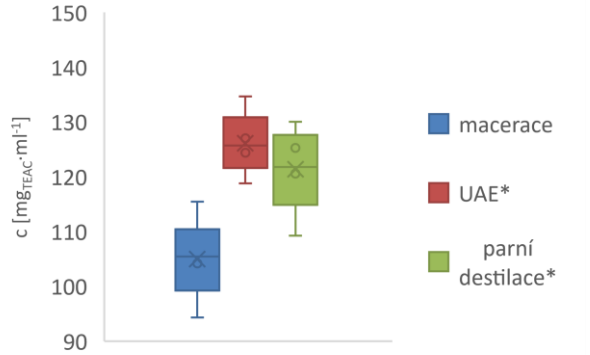
Stejné rozdělení na dvě skupiny lze pozorovat i při sledování vlivu poměru navážky a rozpouštědla. Poměry 1:1, 1:2, 1:3.3 a 1:5 vykazovaly statisticky vyšší účinnosti než poměr 1:10 ($p = 0{,}0996$; $p>\alpha$). Tento fakt můžeme vidět znázorněný v grafu na obrázku 4.

Poměr 1:5 byl v tomto případě zvolen jako optimální nejen z ekonomických důvodů, ale také z důvodu snazší manipulace se získaným extraktem, jelikož při vyšších poměrech je většina získané tekutiny nasáknuta sušenou bylinou, což výrazně znesnadňuje filtraci získaného extraktu. V případě optimálního poměru 1:5 byla antioxidační aktivita 168,89 ± 1,32 $mg_{TEAC}\cdot ml^{-1}$ (TEAC), 115,56 ± 3,97 $mg_{TEAC}\cdot ml^{-1}$ (DPPH) a obsah polyfenolů byl 69,82 ± 0,27 $mg_{GAE}\cdot ml^{-1}$.



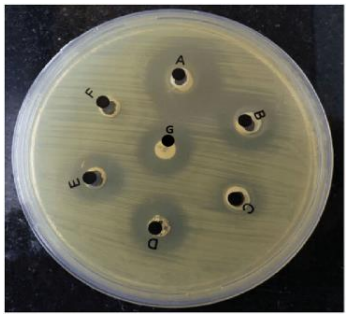
Obrázek 4 Graf závislosti antioxidační aktivity (DPPH) na poměru navážky a rozpouštědla

V grafu na obrázku 5 je poté uveden vliv jednotlivých metod extrakce na antioxidační aktivitu při použití optimálních extrakčních parametrů. Je patrné, a statistické zpracování to potvrzuje ($p = 0{,}198$; $p>\alpha$), že ultrazvuková extrakce (UAE) a parní destilace byly účinnější než prostá macerace. Z důvodu snazšího provedení a také z důvodu menšího rozptylu získaných výsledků byla jako optimální zvolena ultrazvuková extrakce. Antioxidační aktivita se v případě jejího použití pohybovala v rozmezí 173,83 ± 1,68 $mg_{TEAC}\cdot ml^{-1}$ v případě metody TEAC, 126,12 ± 5,11 $mg_{TEAC}\cdot ml^{-1}$ u DPPH a obsah polyfenolů byl 69,53 ± 0,67 $mg_{GAE}\cdot ml^{-1}$.



Obrázek 5 Graf závislosti antioxidační aktivity (DPPH) na metodě

Na obrázku 6 můžeme vidět výsledky antimikrobiálního testování optimálně připraveného extraktu pomocí jamkové difúzní metody. V jamkách A, D se nachází inokulum *Escherichia coli*, v jamkách E, G *Bacillus cereus* a v jamkách C, B je *Candida glabrata* a F je negativní kontrola. Z naměřených inhibičních zón lze potvrdit účinnost extraktu vůči všem třem testovaným mikroorganismům, s tím, že účinnost vůči bakteriím, ať už gram-pozitivním nebo gram-negativním, je vyšší než vůči kvasinkám. Inhibiční zóny se pohybovaly v rozmezí 7,65 ± 0,15 mm u *E. coli*, 6,05 ± 0,15 mm u *B. cereus* a 3,7 ± 0,1 mm u *C. glabrata.*



Obrázek 6 Výsledky antimikrobiálního testování

Závěr

Cílem práce bylo prozkoumat vliv různých způsobů extrakce a dalších extrakčních parametrů na antioxidační a antimikrobiální potenciál extraktu tužebníku jilmového. Povedlo se nalézt optimální podmínky extrakce, při kterých je nejvyšší výtěžnost látek s antioxidačním a antimikrobiálním potenciálem. Jako optimální byla měřením stanovena extrakce v ultrazvukové lázni, s použitím 40% ethanolu jako extrakčního činidla, trvající 90 minut při teplotě 60 °C s poměrem navážky vůči rozpouštědlu 1:5.

Zároveň bylo prokázáno, že mezi účinností jednotlivých způsobů extrakce existují statisticky významné rozdíly. Zkoumané extrakty vykazovaly značný antioxidační potenciál, zároveň byly potvrzeny i jejich antimikrobiální účinky, zejména vůči gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím a lze je tedy využít jako přírodní aditiva do různých druhů potravin, u kterých chceme zvýšit jejich nutriční složení, v navazujících experimentech je plánována aplikace do želatinových cukrovinek.

Dalším měřením bylo zároveň zjištěno, že antioxidační aktivita v delším časovém úseku poměrně

rychle klesá, jako navazující krok na prováděné experimenty bylo navrženo využít různých typu enkapsulace ke zvýšení stability připravovaných extraktů, což je předmětem v současnosti probíhajících experimentů.

Poděkování

Tato práce byla finančně podpořena z projektu specifického výzkumu č.: FCH-S-23-8330.

Reference

[1] SUKHIKH, Stanislav, Svetlana IVANOVA, Liubov SKRYPNIK, et al., 2022. Study of the Antioxidant Properties of Filipendula ulmaria and Alnus glutinosa. *Plants* [online]. 11(18), 132-137. ISSN 2223-7747.

[2] SAMARDŽIĆ, Stevan, Jelena ARSENIJEVIĆ, Dragana BOŽIĆ, Marina MILENKOVIĆ, Vele TEŠEVIĆ a Zoran MAKSIMOVIĆ, 2018. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of Filipendula ulmaria (L.) Maxim. and Filipendula vulgaris Moench. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 213, 132-137. ISSN 03788741.

[3] HARBOURNE, Niamh, Jean Christophe JACQUIER, Dolores O'RIORDAN, et al., 2009. Optimisation of the aqueous extraction conditions of phenols from meadowsweet (Filipendula ulmaria L.) for incorporation into beverages. *Food Chemistry* [online]. 116(3), 722-727. ISSN 03088146.

[4] FARZANEH, A., HADJIAKHOONDI, A., KHANAVI, M., MANAYI, A., BAHRAM soltani, R., & KALKHORANI*, M. (2022). Filipendula ulmaria (L.) Maxim. (Meadowsweet): a Review of Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Research Journal of Pharmacognosy*, *9*(3), 85-106. doi:10.22127/rjp.2021.302028.1781

[5] ZEHIROGLU, Cuma a Sevim Beyza OZTURK SARIKAYA, 2019. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 56(11), 4757-4774 [cit. 2024-03-01]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-019-03952-x-03952-x

[6] SAVINA, Tamara, Valery LISUN, Pavel FEDURAEV a Liubov SKRYPNIK, 2023. Variation in Phenolic Compounds, Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts from Different Plant Organs of Meadowsweet (Filipendula ulmaria (L.) Maxim.). *Molecules* [online]. 28(8), 4757-4774 [cit. 2024-03-01]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28083512

[7] VAN DER AUWERA, Anastasia, Laura PEETERS, Kenn FOUBERT, Stefano PIAZZA, Wim VANDEN BERGHE, Nina HERMANS a Luc PIETERS, 2023. In Vitro Biotransformation and Anti-Inflammatory Activity of Constituents and Metabolites of Filipendula ulmaria. *Pharmaceutics* [online]. 15(4), 4757-4774 [cit. 2024-03-01]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics15041291

[8] KATANIĆ, Jelena, Tatjana BOROJA, Nevena STANKOVIĆ, Vladimir MIHAILOVIĆ, Milan MLADENOVIĆ, Samo KREFT a Miroslav M. VRVIĆ, 2015. Bioactivity, stability and phenolic characterization of Filipendula ulmaria (L.) Maxim. *Pharmaceutics* [online]. 6(4), 1164-1175 [cit. 2024-03-01]. ISSN 2042-6496. Dostupné z: doi:10.1039/C4FO01208A

[9] BOZIARIS, Ioannis S. et al. "Antimicrobial Effect of Filipendula ulmaria Plant Extract Against Selected Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria in Laboratory Media, Fish Flesh and Fish Roe Product." *Food Technology and Biotechnology* 49 (2011): 263-270.

[10] RUBIO, Laura, Mª del Carmen VALIÑO, Mª Jesús EXPÓSITO, Marta LORES a Carmen GARCIA-JARES, 2022. Sourcing New Ingredients for Organic Cosmetics: Phytochemicals of Filipendula vulgaris Flower Extracts. *Cosmetics* [online]. 9(6) [cit. 2024-03-01]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics9060132

[11] OLENNIKOV, Daniil, Nina KASHCHENKO, Nadezhda CHIRIKOVA, Marta LORES a Carmen GARCIA-JARES, 2017. Meadowsweet Teas as New Functional Beverages: Comparative Analysis of Nutrients, Phytochemicals and Biological Effects of Four Filipendula Species. *Molecules* [online]. 22(1) [cit. 2024-03-01]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22010016

[12] IRVING, Miles, 2009. *The Forager Handbook: A Guide to the Edible Plants of Britain*. Londýn: Ebury Press, 416 s. ISBN 978-0091913632.

[13] MIRANDA, Cristiane Grella, Paula SPERANZA, Louise Emy KUROZAWA a Ana Carla KAWAZOE SATO, 2022. Lentil protein: impact of different extraction methods on structural and functional properties. *Heliyon* [online]. 8(11) [cit. 2024-03-01]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2022.e11775

[14] KUMARI, Tapasya, Amit Baran DAS, Sankar Chandra DEKA a Ana Carla KAWAZOE SATO, 2022. Impact of extraction methods on functional properties and extraction kinetic of insoluble dietary fiber from green pea peels: A comparative analysis. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 46(4) [cit. 2024-03-01]. ISSN 0145-8892. Dostupné z: doi:10.1111/jfpp.16476

[15] CASQUETE, Rocío, María José BENITO, Alberto MARTÍN, Ana MARTÍNEZ, María de los Ángeles RIVAS a María de Guía CÓRDOBA, 2022. Influence of different extraction methods on the compound profiles and functional properties of extracts from solid by-products of the wine industry: A comparative analysis. *LWT* [online]. 170(4) [cit. 2024-03-01]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2022.114097

[16] ABUBAKAR, AbdullahiR, Mainul HAQUE, Alberto MARTÍN, Ana MARTÍNEZ, María de los Ángeles RIVAS a María de Guía CÓRDOBA, 2020. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* [online]. 12(1) [cit. 2024-03-01]. ISSN 0975-7406. Dostupné z: doi:10.4103/jpbs.JPBS_175_19

[17] CHEMAT, Farid, Natacha ROMBAUT, Anne-Gaëlle SICAIRE, Alice MEULLEMIESTRE, Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER a Maryline ABERT-VIAN, 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 34(1), 540-560 [cit. 2024-03-01]. ISSN 13504177. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultsonch.2016.06.035

[18] DROUET, Samantha, Emilie A. LECLERC, Laurine GARROS, Duangjai TUNGMUNNITHUM, Atul KABRA, Bilal Haider ABBASI, Éric LAINÉ a Christophe HANO, 2019. A Green Ultrasound-Assisted Extraction Optimization of the Natural Antioxidant and Anti-Aging Flavonolignans from Milk Thistle Silybum marianum (L.) Gaertn. Fruits for Cosmetic Applications: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Antioxidants* [online]. 8(8), 540-560 [cit. 2024-03-01]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox8080304

[19] MACHADO, Carlos Alberto, Fabricia Oliveira OLIVEIRA, Matheus Antônio DE ANDRADE, Katharine Valéria Saraiva HODEL, Herman LEPIKSON, Bruna Aparecida Souza MACHADO, Éric LAINÉ a Christophe HANO, 2022. Steam Distillation for Essential Oil Extraction: An Evaluation of Technological Advances Based on an Analysis of Patent Documents. *Sustainability* [online]. 14(12), 540-560 [cit. 2024-03-01]. ISSN 2071-1050. Dostupné z: doi:10.3390/su14127119

[20] MASANGO, Phineas, Fabricia Oliveira OLIVEIRA, Matheus Antônio DE ANDRADE, Katharine Valéria Saraiva HODEL, Herman LEPIKSON, Bruna Aparecida Souza MACHADO, Éric LAINÉ a Christophe HANO, 2005. Cleaner production of essential oils by steam distillation: An Evaluation of Technological Advances Based on an Analysis of Patent Documents. *Journal of Cleaner Production* [online]. 13(8), 833-839 [cit. 2024-03-01]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2004.02.039

Pôvod a korekcia nulových hodnôt zaznamenaných senzorom GSR pri meraniach odporu kože

Origin and correction of zero values recorded by the GSR sensor in skin resistance measurements

Matúš Šášik[1]
Školiteľ: Štefan Koprda[1]
[1]Katedra informatiky, FPVaI UKF, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,
matus.sasik@ukf.sk, skoprda@ukf.sk

Abstrakt
Príspevok sa zaoberá analýzou problémových hodnôt zo senzora GSR v rámci realizovaného výskumu zameraného na vzájomné prepojenie fyziologických prejavov a emocionálneho stavu človeka prostredníctvom merania odporu kože. Experiment zahŕňal študentov základnej školy, ktorí boli monitorovaní počas rôznych činností. Dáta o odpore kože boli systematicky zaznamenávané a odosielané do centrálnej databázy pomocou platformy Arduino UNO. Štúdia identifikovala dynamiku odporu kože v súvislosti s emocionálnym stavom a rôznymi činnosťami. Počas experiment však boli identifikované technické problémy, najmä opakujúci sa neštandardný výskyt nulových hodnôt. Tieto boli analyzované a riešené prostredníctvom kalibrácie senzora. Integrácia GSR senzora s Arduino UNO a následná optimalizácia napájania viedla k stabilnému a spoľahlivému chodu senzora. Zlepšená kvalita dát potvrdzuje úspech korektívnych opatrení.

Kľúčové slová: GSR sensor, Arduino, nesprávne hodnoty, databáza

Abstract
The paper deals with the analysis of problem values from the GSR sensor in the context of an ongoing research on the interrelation between physiological manifestations and emotional state of humans through the measurement of skin resistance. The experiment involved primary school students who were monitored during various activities. Skin resistance data was systematically recorded and sent to a central database using the Arduino UNO platform. The study identified the dynamics of skin resistance in relation to emotional state and various activities. However, technical problems were identified during the experiment, in particular the recurrent non-standard occurrence of zero values. These were analyzed and addressed through sensor calibration. The integration of the GSR sensor with the Arduino UNO and subsequent optimization of the power supply resulted in stable and reliable operation of the sensor. The improved data quality confirms the success of the corrective measures.

Key Words: GSR sensor, Arduino, incorrect values, database

Úvod

Realizovaný experiment je súčasťou dlhodobého výskumu autorov, pričom štúdia sa zameriavala na objasnenie dynamiky odporu kože v súvislosti s vykonávaním rozmanitých činností a zistenie, či existuje signifikantná korelácia medzi týmto fyziologickým ukazovateľom a vnímaným emocionálnym stavom. Cieľom merania odporu kože bolo analyzovať reakcie študentov pri rôznych činnostiach (napríklad hranie počítačových hier). Táto metóda, známa svojou schopnosťou zachytávať elektrický odpor kože ako indikátor emocionálnej aktivity, poskytuje jedinečný pohľad na prepojenie fyziologických prejavov s psychologickým stavom jednotlivcov, [1-3].

1 Súvisiace výskumy

V súčasnosti môžeme pozorovať nielen globálny rast a trend využívania IoT zariadení, ale v spojení s umelou inteligenciou aj ich zmenu z bežných (tzv. primitívnych) na inteligentné [4]. Stretávame sa tak so smart zariadeniami, ktoré sú súčasťou nášho bežného života, bez toho, aby sme si ich prítomnosť vôbec uvedomovali. Príkladom môžu byť rôzne sensory v automobiloch, smart ovládanie domácnosti, či smart nositeľné náramky, ktoré často náhrádzajú nielen hodinky, ale i mobilný telefón, diár, záznamník. Inteligentné nositeľné zariadenia však disponujú oveľa väšími možnostiami [5]. V posledných rokoch sú ich štandardnou súčasťou rôzne sensory na meranie

fyziologických funkcií človeka [6-7]. Môžu sa teda využívať na monitorovanie parametrov súvisiacich so zdravím, keďže umožňujú meranie fyzickej akltivity prostrednictvom merania počtu krokov, srdcového tepu, EKG, telesnej hmotnosti, alebo odporu kože prostredníctvom GSR pre určenie výšky hladiny cukru z potu [8].

Sensory, ktoré sú súčasťou nositeľných zariadení sú štandardne nakalibrované výrobcom a preto dodahujú len veľmi malú systémovou chybu, resp. odchýlku nepresahujúcu 3-4% [9-10]. Pri vývoji vlastného riešenia sa teda musíme spoľahnúť na odchýlku merania, ktorá bola nakalibrovaná pri sensoroch priamo od výrobcu. Ak používame na meranie fyziologických funkcií sensory ako sú EKG, GSR, EDA, EEG a iné [11-12], je nutné vždy na začiatku ralizácie výskumu potrebné určiť danú odchýlku merania senzora [13], aby sme vedeli určiť, s akou veľkou chybou môžeme počítať, resp. akú presnosť merania dosiahneme pri použití takýchto typov senzorov [14-16].

2 Návrh a realizácia

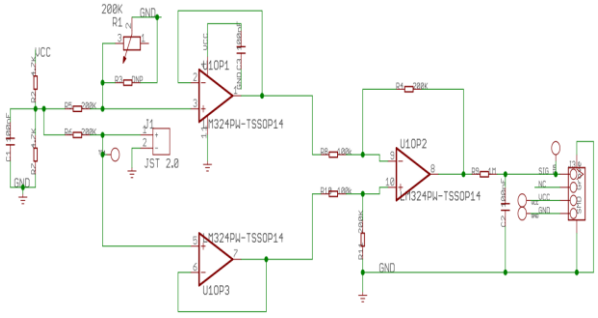
Do výskumu sa zapojilo 50 študentov zo základnej školy. Dĺžka realizácie experimentu bola 6 hodín. Poverený realizátor experimentu umiestnil GSR senzor na ruku, pričom táto činnosť predstavovala prvý krok k zachyteniu detailných informácií o odpore kože. Meral sa tzv. kľudový stav pre určenie fyziologicky štandardného stavu daného jedinca. Následne boli študenti vedení k vykonávaniu špecifikovaných činností, ktoré mali vytvoriť rozmanitý súbor podnetov pre senzor. Týmto spôsobom sme zabezpečili rozmanitosť situácií, ktoré umožnili zachytiť širokú škálu emocionálnych a fyziologických reakcií.

Získané dáta v podobe hodnôt odporu kože, boli systematicky zaznamenávané a automaticky odosielané do centrálnej databázy, pričom na spojenie senzoru s touto databázou sme využili platformu Arduino UNO. Táto integrácia nám umožnila sledovať a uchovávať priebežné dáta z experimentu, čím sme vytvorili robustný základ pre následnú analýzu. Obrázok číslo 1 vizualizuje reprezentáciu celého procesu od získavania dát cez ich spracovanie až po ich odosielanie do databázy.



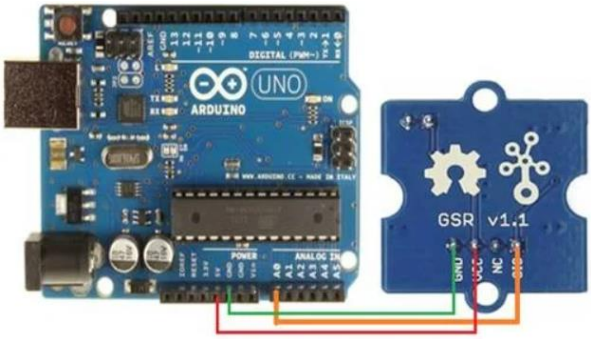
Obr. 1 Schéma spracovania dát
Zdroj: Autor

Technologickým prvkom celého výskumu bola platforma Arduino UNO, ktorá v kombinácii so senzorom slúžila ako spojnica medzi fyziologickými prejavmi študentov a digitálnym spracovaním dát. S pomocou tejto platformy sme nielen monitorovali odpor kože, ale aj zabezpečili efektívne odosielanie informácií do databázového úložiska. Na obrázku číslo 2 môžeme vidieť schématický nákres GSR senzora, ktorý sme používali pre zber dát.



Obr. 2 Schematický nákres GSR senzora
Zdroj: [17]

Realizácia pripojenia senzora k platforme Arduino UNO predstavovala prvý krok v celkovom výskumnom procese. Využili sme schématickú značku, ktorá fungovala ako nevyhnutný navigačný prvok, aby sme systematicky a presne implementovali potrebné pripojenia. Začiatkom tohto procesu bolo spojenie 5V časti senzora s 5V pinom Arduino UNO, čím sme zabezpečili stabilný zdroj napájania pre senzor. Analogový pin A0 bol následne správne priradený k A0 pinu na Arduino UNO, čím sme vytvorili spojenie pre presné sledovanie a záznam hodnôt odporu kože. Ďalšie dôležité pripojenia boli realizované pre P1 a P2 časti senzora, ktoré boli určené pre pripojenie elektród. Tieto elektródy boli špeciálne umiestnené na prstoch účastníkov. Ich konštrukcia s elastickým pogumovaným materiálom zabezpečovala spoľahlivý a bezpečný kontakt s kožou, čo viedlo k efektívnemu zachytávaniu fluktuácií odporu kože počas celého experimentu. Obrázok 3 znázorňuje výsledné pripojenie, ktoré vytvorilo spoľahlivú technologickú infraštruktúru pre náš výskumný experiment. Tým sme dosiahli nielen technickú presnosť, ale aj efektívnosť v procese zaznamenávania a analyzovania hodnôt odporu kože prostredníctvom GSR senzora.



Obr. 3 Zapojenie GSR senzora do Arduino UNO
Zdroj: [18]

Dôležitým komponentom je samotný kód. V nasledujúcom bloku kódu je demonštrované a detailne popísané spracovanie prijatých dát zo senzoru GSR. V rámci cyklu for sa desaťkrát vykonáva čítanie hodnôt zo senzoru (analogRead(GSR)) a tieto hodnoty sa sčítavajú v premennej sum. Tento postup je implementovaný s cieľom eliminovať možné nesprávne hodnoty (glitch). Následne je vypočítaný priemer týchto hodnôt, ktorý slúži ako základ pre výpočet odporu pokožky. Výsledný odpor je potom odoslaný do metódy, ktorá zabezpečuje odoslanie na server.

```
  int numb = 0;
  for (int i = 0; i < 10; i++)  // Na
odstránenie závady spriemerujte 10 meraní
  {
    inputValue = analogRead(GSR);
    numb += inputValue;
    delay(5);
  }
  sensor_average = (numb/ 10) - 2;
  int resistance = ((1024 + 2 *
sensor_average) * 10000) / (516 -
sensor_average);
  //  Serial.print("resistance = ");
  sendPOSTRequest(sensor_average);
  delay(100);
```

Obr. 4 Kód približujúci spracovanie dát
Zdroj: Autor

Dôležitou súčasťou tohto kódu je funkcia sendPOSTRequest, ktorá je zodpovedná za odosielanie hodnôt zo senzoru GSR (Galvanic Skin Response) na server. Funkcia sendPOSTRequest je navrhnutá na vykonávanie HTTP POST požiadavky na server. Začína sa overením pripojenia k serveru pomocou metódy connect, kde SERVER_HOST a SERVER_PORT predstavujú adresu a port servera. V prípade úspešného pripojenia sa vytvára HTTP POST požiadavka obsahujúca hodnotu získanú zo senzoru GSR (gsrValue). Táto hodnota je pridávaná do požiadavky pomocou metód print. Konkrétne, hodnota gsrValue sa pridáva do URL parametra s názvom "gsr". Požiadavka obsahuje aj informácie o hostiteľskom serveri, ako je adresa a uzatváranie pripojenia.

```
void sendPOSTRequest(int value) {
  if (client.connect(SERVER_HOST,
SERVER_PORT)) {
    client.print("POST
/insert_gsr.php?gsr=");
    client.print(value);
    client.println(" HTTP/1.1");
    client.println("Host:
www.physcatch.sk");
    client.println("Connection: close");
    client.println();
  } else {
    Serial.println("Connection to server
failed.");
  }
}
```

Obr. 5 Kód približujúci odosielanie dát
Zdroj: Autor

V prípade neúspešného pripojenia sa na konzolu vypíše chybové hlásenie "Connection to server failed." Funkcia je návrhovo vytvorená tak, aby informovala o stave pripojenia a vykonala príslušné akcie v závislosti od výsledku. Databázová štruktúra, bola navrhnutá tak, aby uchovávala dôležité údaje o prijatých záznamoch v časovej sérii. Každý záznam v tejto databáze je jedinečne identifikovaný pomocou jedinečného identifikátora (ID), ktorý slúži na jednoznačné rozlíšenie medzi rôznymi záznamami. Toto ID je priradené každému prijatému záznamu a zabezpečuje, že každý záznam má svoj jedinečný identifikátor v rámci databázy.

Okrem ID obsahuje databázová štruktúra aj časovú zložku, ktorá zaznamenáva čas, kedy bol daný záznam prijatý. Táto časová zložka je kľúčovým prvkom, ktorý umožňuje usporiadať a analyzovať záznamy podľa ich časového priebehu. Každý záznam je teda spojený s konkrétnym časovým bodom alebo intervalom, v ktorom bol zachytený. Ďalším dôležitým atribútom každého záznamu je hodnota. Táto hodnota reprezentuje konkrétnu meranú veličinu, udalosť alebo stav v danom časovom okamihu. Vizuálny príklad databázovej štruktúry je možné vidieť na obrázku 6.

id	timeStamp	measuredResistance
32	2024-02-20 15:50:32	510
33	2024-02-20 15:50:32	509
34	2024-02-20 15:50:33	502
35	2024-02-20 15:50:33	507

Obr. 6 Príklad databázovej štruktúry
Zdroj: Autor

3 Výzvy a problémy

V priebehu experimentu sme sa nevyhli technickým výzvam, ktoré viedli k nečakaným interferenciám a ovplyvnili tak priebeh a konečné výsledky našej štúdie. Zvlášť problematický bol opakovane sa vyskytujúci incident, kedy senzor začal po určitom časovom období odosielať do databázy nulové hodnoty. Táto anomália sa nepravidelne objavovala.

Napriek snahám minimalizovať vplyv takýchto technických problémov na priebeh experimentu, sa ukázalo, že opakovaný výskyt nulových hodnôt vážne narušoval konzistentnosť dát a spoľahlivosť meraní. Problém sa vyskytoval aj v situáciách, keď senzor bol počas krátkej prestávky odpojený a následne pripojený znovu. Zahájenie dôkladnej analýzy bolo nevyhnutné na zachovanie integrity a relevancie nášho výskumného úsilia.

Na nasledujúcom obrázku 5 je môžeme pozorovať výstupné zachytenie prijatých dát, ktoré sa nečakane ustálili na nulovej hodnote. Tento nežiaduci jav vytvoril výzvu v správnej interpretácii a využití získaných informácií. Vzhľadom na náš experimentálny kontext sme však očakávali, že hodnoty budú reflektovať dynamiku odporu kože v širokom rozmedzí. Požadovaný korektný rozsah hodnôt bol preto definovaný v prijateľnom rozpätí 0-560, čo sme považovali za valídny odbor merania kožného odporu.

id	timeStamp	measuredResistance
11354	2024-02-22 15:57:11	0
11355	2024-02-22 15:57:11	0
11356	2024-02-22 15:57:12	0
11357	2024-02-22 15:57:12	0

Obr. 7 Príklad zaznamenania nulových (chybných) dát
Zdroj: Autor

4 Analýza a riešenie problému

Kľúčovým momentom v rámci našej analyticko-diagnostickej fázy bolo dôsledné pozorovanie správania GSR senzora a systematizované nasimulovanie nežiaduceho stavu. Simuláciou sme zaznamenali, že senzor začal systematicky generovať nulové hodnoty po niekoľkých minútach aktívneho využívania a tento problém sa pravidelne opakoval. Pre priamu diagnostiku sme využili multimeter, ktorý nám poskytol presný obraz o napájacích podmienkach senzora. úsilia.

Dôležitým zistením bolo, že napätie, ktoré senzor prijal, sa pohybovalo iba okolo hodnoty 2,5 voltov, čo bolo pod optimálnym pracovným napätím senzora stanoveným na 5 voltov. Táto diskrepancia v napájacom napätí viedla k našej hypotéze, že trpí nedostatkom potrebného elektrického impulzu na spoľahlivé fungovanie. Vzhľadom na skutočnosť, že senzor disponoval vnútorným trimerom, rozhodli sme sa využiť túto možnosť na kalibráciu.

Postupné nastavovanie trimra a opakované meranie nám nakoniec umožnilo dosiahnuť optimálnu hodnotu 5 voltov, ktorá bola v súlade s ideálnymi parametrami senzora. Tento korekčný proces bol náročný na systematické testovanie a experimentovanie, pričom každý krok vyžadoval precízne ladenie a odbornú zručnosť.

Výsledkom našich snáh bolo dramatické zlepšenie kvality prijímaných dát. Senzor prestal úplne generovať nulové hodnoty aj po uplynutí dlhšieho časového úseku, čo jasne svedčilo o úspechu našich korektívnych opatrení. Týmto spôsobom sme nielen identifikovali a odstránili technický problém, ale aj zabezpečili stabilný a spoľahlivý chod senzora, čo bolo esenciálne pre kvalitné zaznamenávanie dát v priebehu nášho výskumu. Obrázok číslo 8 poskytuje vizuálny záznam o prijatých dátach do nášho databázového úložiska z funkčného GSR senzora.

id	timeStamp	measuredResistance
398525	2024-02-22 09:31:58	274
398524	2024-02-22 09:31:57	275
398523	2024-02-22 09:31:57	275
398522	2024-02-22 09:31:56	277

Obr. 8 Príklad správne generovaných dát
Zdroj: Autor

Prijaté dáta demonštrujú žiaduci rozsah hodnôt, ktorý je v súlade s očakávaným spektrom reakcií odporu kože. Tieto správne fungujúce dáta sú dôkazom účinnosti našich riešení, ktoré eliminujú technické problémy a zabezpečujú spoľahlivý a konzistentný prenos informácií do nášho výskumného úložiska.

Obrázok 8 nielen dokumentuje úspech v riešení predošlých technických výziev, ale aj potvrdzuje, že naše korigujúce opatrenia viedli k stabilnému fungovaniu senzora a bezchybnému zaznamenávaniu hodnôt odporu kože. Týmto spôsobom sme dosiahli dôveryhodné a kvalitné dáta, ktoré budú neoceniteľným prínosom pre ďalší vedecký výskum.

Záver

V priebehu výskumu sme sa stretli s technickými výzvami, ktoré výrazne ovplyvnili priebeh experimentu a kvalitu získaných dát. Avšak, naša systematická analýza a odhodlanie riešiť problémy ukázali, že s dôkladným pohľadom na technologické aspekty sme boli schopní úspešne zvládnuť dané výzvy.

Jedným z kľúčových problémov bola opakujúca sa anomália, pri ktorej senzor generoval nulové hodnoty. Vďaka diagnostike za pomoci multimetra sme identifikovali, že nedostatočné napájacie napätie senzora bolo korekčne riešiteľné prostredníctvom vnútorného trimra. Tento proces vyžadoval ladenie a viacero testovacích iterácií, ale výsledkom bola obnova optimálnych pracovných podmienok senzora.

Obrázok číslo 8 následne dokumentuje úspešné meranie a prenos dát do databázy, čo potvrdzuje, že naše riešenia viedli k stabilnému fungovaniu senzora. Dáta, ktoré sme získali za pomoci merania, sú neoceniteľným prínosom pre pôvodný výskumný zámer skúmať vzťah medzi odporom kože a emocionálnymi stavmi.

Celkový priebeh výskumu nám poskytol cenné znalosti v oblasti technických výziev a dôrazu na dôsledné technologické ladenie. Sme presvedčení, že naše riešenia neiboli len odpoveďou na technické problémy, ale aj príkladom flexibilného prístupu k výskumu a neustáleho zlepšovania sa.

Tento výskumný experiment sa zameral na meranie odporu kože u študentov pomocou GSR senzora. Štúdia prebiehlo v rámci školského projektu, kde účastníci nosili senzor počas vykonávania rôznych činností, pričom dáta o odpore kože sa automaticky odosielali do databázy cez Arduino UNO. Avšak, technické problémy, spočívajúce v nulových hodnotách odosielaných senzorom, vznikli po krátkej dobe od začiatku meraní. Podrobná analýza odhalila, že senzor obsahoval korekčný trimer, ktorý vyžadoval opakované testovanie a ladenie. Po úspešnom riešení technickej výzvy sme pokračovali v meraniach, ktoré nám poskytli hodnotné dáta na prieskum vzťahu medzi odporom kože a emocionálnymi stavmi. Tento abstrakt podčiarkuje dôležitosť technickej presnosti pri výskume s GSR senzorom a zároveň zdôrazňuje význam riešenia problémov, ktoré môžu ovplyvniť výsledky takýchto experimentov.

Poďakovanie

Chcel by som touto cestou vyjadriť veľkú vďačnosť môjmu školiteľovi, doc. Ing. Štefanovi Koprdovi, PhD., za jeho neoceniteľnú pomoc a podporu počas riešenia mojej práce.

Použitá literatúra

[1] T. Pakarinen, J. Pietila, and H. Nieminen. 2019. Prediction of Self-Perceived Stress and Arousal Based on Electrodermal Activity. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, pp. 2191–2195. EMBC.2019.8857621.

[2] D. Jaiswal, D. Chatterjee, R. Gavas, R. Kumar Ramakrishnan, and A. Pal. 2021. Person and Stressor Independent Generic Model for Stress Detection Using GSR. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference. pp. 7195–7198. EMBC46164.2021.9630615.

[3] D. Jaiswal, D. Chatterjee, B. S. Mithun, R. K. Ramakrishnan, and A. Pal. 2023. GSR Based Generic Stress Prediction System. UbiComp/ISWC 2023 Adjunct - Adjunct Proceedings of the 2023 ACM International Joint Conference on Pervasive and Ubiquitous Computing and the 2023 ACM International Symposium on Wearable Computing. pp. 433–438. 10.1145/3594739.3610734.

[4] M. Karatas, L. Eriskin, M. Deveci, D. Pamucar, and H. Garg. 2022. Big Data for Healthcare Industry 4.0: Applications, challenges and future perspectives. Expert Systems with Applications. vol. 200, pp. 116912. 10.1016/J.ESWA.2022.116912.

[5] S. Gedam and S. Paul. 2021. A Review on Mental Stress Detection Using Wearable Sensors and Machine Learning Techniques. IEEE Access. vol. 9, pp. 84045–84066. 10.1109/ACCESS.2021.3085502.

[6] R. Ahmad, M. Hämäläinen, R. Wazirali, and T. Abu-Ain. 2023. Digital-care in next generation networks: Requirements and future directions. Computer Networks. vol. 224, pp. 109599. 10.1016/J.COMNET.2023.109599.

[7] B. Renó, E. M. Oliveira, and A. D. Souza. 2023. A Systematic Literature Review on Trustworthiness for Applications Used in eHealth Environments. Journal of Multidisciplinary Healthcare. vol. 16, pp. 3393. 10.2147/JMDH.S429071.

[8] R. Kansara, P. Bhojani, and J. Chauhan. 2018. Designing Smart Wearable to measure Health Parameters. International Conference on Smart City and Emerging Technology. 10.1109/ICSCET.2018.8537314.

[9] J. Francisti, Z. Balogh, J. Reichel, M. Magdin, Š. Koprda, and G. Molnár. 2020. Article application experiences using iot devices in education. Applied Sciences (Switzerland). vol. 10, no. 20. 10.3390/app10207286.

[10] V. Setyowati, J. Muninggar, and M. R. S. Shantina. 2017. Design of heart rate monitor based on piezoelectric sensor using an Arduino. Journal of

Physics: Conference Series. vol. 795, no. 1. pp. 012016. 10.3390/app10207286.
[11] Y. Ouyang, M. Liu, C. Cheng, Y. Yang, S. He, and L. Zheng. 2023. Monitoring Inattention in Construction Workers Caused by Physical Fatigue Using Electrocardiograph (ECG) and Galvanic Skin Response (GSR) Sensors. Sensors 2023. vol. 23, no. 17. pp. 7405. 10.3390/S23177405.
[12] A. Sukumaran and A. Manoharan. 2023. A survey on automatic engagement recognition methods: online and traditional classroom. Indonesian Journal of Electrical Engineering and Computer Science. vol. 30, no. 2. pp. 1178–1191. 10.11591/IJEECS.V30.I2.PP1178-1191.
[13] E. S. Siqueira, M. C. Fleury, M. V. Lamar, A. Drachen, C. D. Castanho, and R. P. Jacobi. 2023. An automated approach to estimate player experience in game events from psychophysiological data. Multimedia Tools and Applications. vol. 82, no. 13. pp. 19189–19220. 10.1007/S11042-022-13845-5.
[14] P. A. Balaji and V. Sugumaran. 2023. Reducing cost with MEMS sensor and improving performance of classifier using probabilistic voting method. Measurement Science and Technology. vol. 35, no. 1. pp. 015134. 10.1088/1361-6501/AD03B8.
[15] R. F. Chisab, A. A. Majeed, and H. S. Hamid. 2023. IoT-Based Smart Wireless Communication System for Electronic Monitoring of Environmental Parameters with a Data-Logger. International Journal of Electrical and Electronic Engineering & Telecommunications. vol. 12, no. 6. pp. 450–458. 10.18178/IJEETC.12.6.450-458
[16] J. Kaur, H. S. Gill, R. K. Mathew, and A. S. Nadumuri. 2022. Arduino based height measurement system. Proceedings of the 4th International Computer Sciences and Informatics Conference (ICSIC 2022). vol. 2979, no. 1. pp. 020045. 10.1063/5.0122654/2917896
[17] Speed Document [online]. 2024 [cit. 27.02.2024]. Dostupné z: https://github.com/SeeedDocument/Grove-GSR_Sensor/raw/master/res/Grove%20-%20GSR%20v1.0%20SCH.pdf
[18] RF Wireless Word [online]. 2024 [cit. 27.02.2024]. Dostupné z: https://www.rfwireless-world.com/Terminology/GSR-sensor-interfacing-with-Arduino-Code-and-schematic.html

Bzdochy (Heteroptera) v potrave mláďat a dospelcov včelárika zlatého (*Merops apiaster*) v Podunajsku

Heteropteran (Heteroptera) in the Diet of juveniles and adults of European Bee-Eater (*Merops apiaster*) in Podunajsko

Eva Schlimbachová[1,2], Vladimír Hemala[3], Katarína Goffová[4]

Školiteľ: Peter Gajdoš[5]

[1]Katedra ekológie a environmentalistiky, FPVaI UKF, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,

[2,5]Ústav krajinnej ekológie SAV, Bratislava, Pobočka Nitra, Akademická 2, 949 01 Nitra,

[3] Správa CHKO Biele Karpaty, Trenčianska ul. 31, 914 41 Nemšová,

[4]Katedra zoológie, PRIF UK, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava,

[1] eva.schlimbachova@ukf.sk, [2] eva.schlimbachova@savba.sk, [3] vladimir.hemala@gmail.com,

[4]katarina.goffova@uniba.sk, [5]nrukgajd@savba.sk

Abstrakt

Práca prináša najaktuálnejšie informácie o hmyze zachytenom v potrave mláďat a dospelcov včelárika zlatého (*Merops apiaster* Linnaeus, 1758) v oblasti Podunajska s dôrazom na bzdochy (podrad Heteroptera). Výskum bol realizovaný v kolónii včelárikov v Radvani nad Dunajom. Bzdochy boli včelárikmi odchytávané ako tretia najpočetnejšia skupina hmyzu (2,79 %), pričom najpočetnejšiu skupinu tvorili blanokrídlovce (Hymenoptera – 77,96 %) a za nimi nasledovali chrobáky (Coeloptera – 18,08 %). Nakoľko potrava včelárikov závisí od aktuálnej ponuky, Radvaň nad Dunajom sa ukázala ako centrum diverzity hmyzu. Zatiaľ čo podiel bzdôch v ich potravovom spektre nezohrával významnú úlohu, druhové zastúpenie bzdôch v potrave mláďat a dospelcov sa líšilo, pričom bol zaznamenaný vyšší počet taxónov u mláďat včelárika zlatého.

Kľúčové slová: potravová ekológia mláďat a dospelcov, vývržky, hmyz, Heteroptera, Slovensko

Abstract

The work provides the most up-to-date information about insects caught in the diet of juveniles and adults of the European bee-eater (*Merops apiaster* Linnaeus, 1758) in Podunajsko area, with an emphasis on true bugs (order Heteroptera). The research was conducted in a European bee-eater colony in Radvaň nad Dunajom. True bugs were captured by bee-eaters as the third most numerous group of insects (2,79 %), with the most numerous group being hymenopterans (Hymenoptera – 77,96 %), followed by beetles (Coleoptera – 18,08 %). As the diet of bee-eaters depends on the current supply, Radvaň nad Dunajom proved to be a center of insect diversity. While the proportion of true bugs in their diet did not play a significant role, the species composition of true bugs in the diet of juveniles and adults differed, with a higher number of taxa recorded in the diet of European bee-eater juveniles.

Key Words: diet ecology of juveniles and adults, pellets, insect, Heteroptera, Slovakia

Úvod

Včelárik, prezývaný aj ako „papagáj Slovenska“, je pomerne rozšírený nielen v Afrike a Ázii, ale nakoľko je sťahovavý, obýva aj suché a teplé oblasti Európy [1]. Početnosť týchto vtákov je v posledných rokoch na Slovensku stabilná, avšak stále je ohrozovaná deštrukciou hniezdísk, či stratou diverzity v krajine (aj ich potravových možností), preto ich počet môže bez aktívnej ochrany klesať.

Potravové spektrum včelárika je limitované možnosťami oblasti, v ktorej sa momentálne nachádza a hniezdi. Potravovému spektru včelárikov sa venovalo doposiaľ viacero prác [napr. 2, 3, 4, 5], ktoré sa zhodujú, že dôležitú zložku potravy včelárika, ako už aj jeho názov naznačuje, tvorí prevažne rad Hymenoptera.

Okrem tohto dominujúceho radu, nájdeme v jeho jedálničku aj iné, a to rady Coleoptera, Lepidoptera, Odonata a ďalšie. Radu Hemiptera, konkrétne podradu Heteroptera sa veľa pozornosti neušlo. V publikovaných štúdiách sa nenachádzali vôbec alebo iba veľmi okrajovo.

Predložený príspevok je zameraný na bzdochy v potrave včelárika zlatého (*Merops apiaster* Linnaeus, 1758). Ide o čiastkové výsledky mojej diplomovej práce [6], ktorá nadväzovala na bakalársku prácu od Bočincovej [7].

Bzdochy sú ľahko rozpoznateľné vďaka ich prenikavému, nepríjemnému zápachu, ktorý produkujú pachovými žľazami. No nie táto vlastnosť ich však odlišuje od ostatných živočíchov. Ich typickým znakom je premenený prvý pár krídel, ktorý označujeme ako polokrovky (hemielytrae) [8]. Zástupcovia podradu Heteroptera sú často ľuďmi odsudzovaní aj napriek ich dôležitosti v potravovej sieti a veľkej diverzite a kráse niektorých druhov. Cieľom výskumu bolo zamerať sa na podrad Heteroptera ako súčasť potravovej ekológie mláďat a dospelcov včelárika zlatého, nakoľko z územia Slovenska chýbajú komplexnejšie údaje o druhovom zastúpení tohto podradu v potrave včelárika zlatého.

1. Materiál a metódy

V tejto časti si opíšeme potrebný materiál pre výskum ako aj metódy, ktoré sme použili pri zbere materiálu alebo vyhodnocovaní výsledkov.

1.1 Analýza zvyškov potravy včelárika zlatého

Zvyšky potravy včelárika, resp. jeho vývržky, sme získali z okolia aj priamo z hniezdnych nôr včelárikov (Tab. 1). Vývržky dospelcov z okolia nôr sa zbierali v mesiacoch máj až september v rokoch 2016 až 2018. Pri zbere sa bral ohľad na hniezdiace jedince, aby nedošlo k ich vyplašeniu.

Tab. 1 Počty odobraných vzoriek z hniezd mláďat včelárika zlatého (zmiešané a rozdrvené zvyšky potravy) a vývržkov dospelcov (odoberané po jednotlivých vývržkoch) na lokalite Radvaň nad Dunajom.

	rok	**počet vzoriek**
Zmiešané vývržky mláďat z hniezd	2016	4
	2017	2
	2018	3
	spolu	**9**
Jednotlivé vývržky dospelcov	2016	100
	2017	100
	2018	100
	spolu	**300**

Nakoľko časti tiel hmyzu bývajú po natrávení včelárikom rozpadnuté a zničené, len silnejšie chitinizované hlavičky ostávajú pomerne dobre zachované a sú vhodné pre následné spracovanie a určovanie konkrétnych druhov bzdôch. Taktiež bývajú hlavičky vyblednuté, farebne odlišné alebo zdeformované, čo komplikuje ich determináciu. Hlavičky bzdôch boli od zvyšku potravového spektra separované pomocou stereomikroskopu Zeiss Stemi DV4. Materiál z povysávaných hniezd bol prebraný celý, z vykopaných hniezd sa preberala podobná alikvota, približne jedna štvrtina získaného materiálu z hniezda.

Poškodené hlavičky bzdôch boli determinované na najnižší možný taxón pomocou aktuálnej klasifikácie a nomenklatúry [9, 10, 11, 12, 13]. Materiál bol následne porovnaný s kompletnými exemplármi (celými jedincami) zo súkromnej zbierky Dr. Vladimíra Hemalu. Zvyšné hlavičky a časti tiel iných prítomných živočíchov boli zaradené do radov vďaka pomoci viacerých členov tímu Dr. Kataríny Goffovej.

Rozdiely medzi potravou dospelých jedincov a mláďat boli porovnávané nepárovým Mann-Whitney testom a chí-kvadrát testom (χ^2) pomocou softvéru PAST4.03 [14]. Diverzita potravy včelárika bola vyhodnocovaná pomocou počtu a početnosti taxónov, dominancie, indexu diverzity (Shanon a Weawerov index) a ekvitability [15] taktiež v softvéri PAST4.03 [14].

2. Výsledky a diskusia

Na základe získaného materiálu (Tab. 1) sa nám v potrave včelárika zlatého v Radvani nad Dunajom podarilo získať 15 600 hláv hmyzu. Počas troch rokov sme získali 300 vývržkov od dospelých jedincov, z ktorých sme určili 160 jedincov bzdôch (z celkového počtu 4 349), pričom pri zbere hniezdneho materiálu mladých jedincov včelárika (kde boli vývržky rozdrvené a pomiešané), sme počas týchto troch rokov zozbierali materiál z 9 hniezd, ktorý obsahoval 440 jedincov bzdôch (z celkového počtu 11 251).

Bzdochy tvorili u dospelcov podiel 3,68 % a u mláďat 3,91 %, pričom sa tento podiel v potrave medziročne

líšil a najvyšší (χ^2 = 35,115; p < 0,001) bol medzi rokmi 2016 a 2018 (Obr. 1).

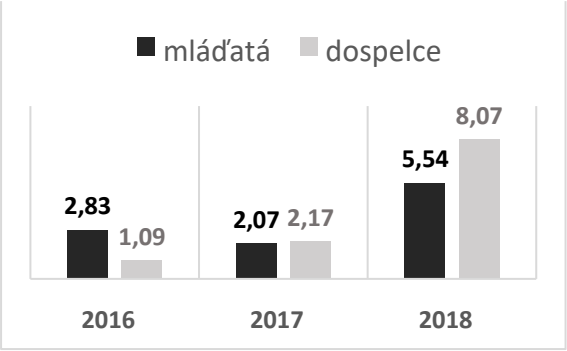
Zo vzoriek sme určili deväť druhov a osem rodov bzdôch. Druhové zastúpenie bzdôch v potrave mláďat a dospelcov sa líšilo, ale rozdiel medzi zastúpením bzdôch v potrave mláďat (400 ex.) a dospelcov (160 ex.) včelárika nebol preukazný (χ^2 = 0,666; p = 0,414; Mann-Whitney test: z = 1,309; p = 0,190).

Čo sa druhového spektra týka, vyšší počet taxónov sme zaznamenali u mláďat (23 taxónov), pričom nasledujúce druhy boli nájdene iba v potrave mláďat: *Gonocerus acuteangulatus* (Goeze, 1778), *Pinthaeus sanguinipes* (Fabricius, 1781), *Odontoscelis lineola* Rambur, 1839 a rod *Gonocerus* Berthold, 1827. V potrave dospelcov sme zachytili 21 taxónov, z toho iba v potrave dospelcov boli zachytené druhy: *Ceraleptus lividus* Stein, 1858, *Eurydema ornata* (Linnaeus, 1758) a rod *Podops* Laporte de Castelnau, 1833. Čísla síce neukazujú zásadný rozdiel v zastúpení bzdôch v potrave mláďat a dospelcov včelárika, no ich hodnoty dominancie sú rozdielne. Dominancia, vypovedajúca o významnosti jednotlivých druhov v spoločenstve, poukazuje na to, že zloženie potravy dospelcov je vyrovnanejšie ako potrava mladých jedincov, kde zreteľne prevažuje jeden druh. Ďalej bola diverzita hodnotená indexom Shannona a Weawera, na základe ktorého môžeme konštatovať, že štruktúra potravového spektra dospelcov má vyváženejší pomer počtu druhov k počtu jedincov. V potrave dospelcov bolo zachytených menej druhov, pomer zisteného indexu diverzity k maximálnemu možnému indexu diverzity odhalil vyššiu celkovú vyrovnanosť a tým aj potenciálnu diverzitu v potrave dospelých jedincov (Tab. 2). Mláďatá sú pravdepodobne často kŕmené nárazovo jedným druhom, ktorý v danom období práve dominuje, lebo pre dospelé jedince je výhodné vracať sa naspäť k jednému zdroju a nie strácať čas hľadaním rôznorodej potravy.

Vo všeobecnosti by pre dospelcov mohlo byť výhodnejšie kŕmenie mláďat väčšou korisťou hlavne kvôli vyššej energetickej hodnote, keďže je korisť nosená do hniezda po jednom. No aj napriek tomu mláďatá neboli výhradne kŕmené veľkou korisťou. Pravdepodobne práve kvôli zabezpečeniu pestrejšej a teda zdravšej stravy pre mláďatá [napr. 16, 17].

Tab. 2 Vyhodnotenie diverzity potravového spektra dospelcov a mláďat včelárika zlatého z rokov 2016 až 2018 zachytenej v Radvani nad Dunajom.

	dospelce	mláďatá
Počet taxónov bzdôch	21	23
Počet jedincov bzdôch	160	440
Dominancia	0,545	0,398
Index Shannona a Weawera	0,798	1.005
Ekvitabilita	0,726	0,915



Obr. 1 Percentuálny podiel (%) bzdôch u mláďat a dospelcov včelárika zlatého v rokoch 2016 až 2018.

Potrava dospelcov a mláďat včelárikov bola väčšinou skúmaná spoločne, viacero autorov však [18, 19, 20, 21] zistilo, že mláďatá viac napredovali a ich váha výraznejšie stúpala pri kŕmení rôznorodou potravou, ako pri kŕmení len zopár druhmi, napríklad vážkami alebo včelami, aj napriek tomu, že ide o výživné a veľké druhy.

Autorka Fry [2] vo svojej práci poukazuje na to, že mláďatá prijímajú väčšie množstvo blanokrídlovcov oproti dospelým jedincom. To potvrdzuje aj Krištín [4], ktorý uvádza 66,2 % blanokrídlovcov v potrave dospelcov, pričom u mláďat tento rad tvorí 72,8 %. V potrave dospelcov ďalej dominoval rad Coleoptera (23,9 %), zatiaľ čo u mláďat bol tento rad zastúpený iba v 12,2 %. Môže to mať súvis s lepším trávením sklerotizovanej stavby chrobákov dospelcami [4].

Čo sa týka porovnania bzdôch v potrave mláďat a dospelcov na Slovensku, iba Krištín [4] uvádza presné čísla, a to 2,5 % v potrave mláďat a 2,7 % v potrave dospelcov. Bzdochy boli v potrave mláďat a dospelých jedincov v rokoch 2016 až 2018 na lokalite Radvaň nad Dunajom približne rovnako zastúpené aj v nami potvrdených výsledkoch výsledkoch, pričom rozdiely sa medziročne líšili a celkovo najviac bzdôch (13,61 %) v potrave včelárikov bol zaznamenaný v roku 2018. V tom istom roku bol zaznamenaný aj najväčší rozdiel medzi podielom bzdôch u mláďat, kedy dostali o 2,53 % viac bzdôch ako si odchytili dospelce.

Vo všeobecnosti je ale komplikované porovnávať predložené výsledky s inými štúdiami, nakoľko viacerí autori napr. [21, 22, 23, 24] vo svojich prácach použili metódy ako pozorovanie či fotodokumentáciu. Oproti nami použitému zberu materiálu z hniezd a vývržkov sú tieto metódy menej výpovedné, nakoľko sa môžu uskutočňovať väčšinou iba počas kŕmenia a z diaľky. Aj keď včelárik s veľkou pravdepodobnosťou bzdochy na lokalite odchytával, vo výsledkoch ich autori neuvádzajú.

Na základe nášho výskumu sa pripravuje identifikačný kľúč pre lepšie určovanie bzdôch v potrave včelárika zlatého, ktorý obsahuje momentálne 49 taxónov. Práca bude obsahovať aj zoznam doposiaľ zaznamenaných bzdôch v potrave včelárika zlatého vo svete, ktorý momentálne obsahuje 35 druhov, 32 rodov a 17 čeľadí podradu Heteroptera.

Záver

Predložený príspevok prináša čiastkové výsledky z obsiahlejšieho výskumu potravnej ekológie včelárika zlatého [6, 7] realizovaného v rámci projektu LIFE BeeSandFish. Vďaka výskumu sme dospeli k viacerým záverom. Počas troch rokov sme získali 300 vývržkov, z ktorých sme určili 160 jedincov bzdôch, pričom pri zbere hniezdneho materiálu mladých jedincov včelárika, sme počas týchto troch rokov zozbierali materiál z 9 hniezd, ktorý obsahoval 440 jedincov bzdôch.

Na základe dát z rokov 2016 – 2018, neboli zistené preukazné rozdiely v podiele bzdôch v potrave mláďat a dospelých jedincov, pričom v potrave mláďat bolo zaznamenaných viac taxónov a potrava dospelých jedincov bola preukazne vyrovnanejšia.

Praktickým výstupom výskumu potravy včelárika zlatého v rámci projektu je osvetová brožúra pre včelárov s názvom Včelárik a včely (https://broz.sk/wpcontent/uploads/2023/04/BeeSandFish_brozura_VcelarikVcely_SK.pdf; 6.3.2024), kde boli zapracované aj predložené výsledky.

Poďakovanie

Za pomoc so štatistickým vyhodnotením a vyfotografovaním hlavičiek ďakujem Mgr. Samovi Krčmárikovi a Mgr. Matúšovi Kúdelovi, PhD..

Výskum bol realizovaný v rámci projektu LIFE BeeSandFish - LIFE12 NAT/SK/001137: Ochrana brehule hnedej, rybárika riečneho a včelárika zlatého v dunajsko-moravskom regióne.

Použitá literatúra

[1] HUME, R. 2002. Birds of Britain and Europe. Darling Kindersley Limited. London. 220–221.

[2] FRY, C. H. 1984. The Bee-eaters. Buteo Books, Vermillion 304 pp.

[3] INGLISA, M. et al. 1993. The diet of a coastal population of European Bee-eaters (*Merops apiaster*) compared to prey availability (Tuscany, cenral Italy). Bollettino di zoologia 60: 307–310.

[4] KRIŠTÍN, A. 1994. Breeding biology and diet of the bee-eater (*Merops apiaster*) in Slovakia. Biologia 49(2): 273–279.

[5] MARNICHE, F. et al. 2007. Le régime alimentaire du Guêpier d'Europe *Merops apiaster* dans le Parc national de l'Ichkeul (Tunisie). Revue d'Ecologie – La Terre Et La Vie 62: 351–362.

[6] SCHLIMBACHOVÁ, E. 2023. Bzdochy (Heteroptera) v potrave včelárika zlatého (*Merops apiaster*). Diplomová práca. Katedra zoológie Prif UK, Bratislava. 87 pp.

[7] BOČINCOVÁ, J. 2021. Bzdochy (Heteroptera) v potrave včelárika zlatého (*Merops apiaster*). Bakalárska práca. Katedra zoológie Prif UK, Bratislava. 55 pp.

[8] CASSIS, G. 2019. True Bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera): Evolution, Classification, Biodiversity and Biology. Reference Module in Life Sciences, Elsevie.

[9] AUKEMA, B. & RIEGER, Ch. 1995. Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region. Volume 1. The Netherland Entomological Society, Amsterdam. 222 pp.

[10] AUKEMA, B. & RIEGER, Ch. 1996. Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region. Volume 2. The Netherland Entomological Society, Amsterdam. 361 pp.

[11] AUKEMA, B. & RIEGER, Ch. 1999. Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region. Volume 3. The Netherlands Entomological Society, Amsterdam. 577 pp.

[12] AUKEMA, B. & RIEGER, Ch. 2001. Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region. Volume 4. The Netherland Entomological Society, Amsterdam. 346 pp.

[13] AUKEMA, B. et al. 2013. Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region. Volume 6. The Netherland Entomological Society, Amsterdam. 629 pp.

[14] HAMMER, Ø. et al. 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica, vol. 4, issue 1, art. 4: 9pp., 178kb.
[15] KOVÁČ, V. 2008. Ekológia učebné testy. Katedra ekológie, PRIF UK, Bratislava. 74 pp.
[16] KREBS, J. R. & AVERY, M. I. 1985. Central Place Foraging in the European Bee-eater, *Merops apiaster*. Journal of Animal Ecology 54: 459–472.
[17] ARBEITER, S. et al. 2014. Seasonal Shift in the Diet Composition of European BeeEaters *Merops apiaster* at the Northern Edge of Distribution. Ardeola 61(1): 161–170.
[18] FRY, C. H. 1983. Honeybee Predation by BeeEaters, with Economic Considerations. Bee World 64(2): 65–78.
[19] KREBS, J. R. & AVERY, M. I. 1984. Chick growth and prey quality in the European Bee-eater (*Merops apiaster*). Oecologia 64(3): 363–368.
[20] LESSELLS, C. M. & AVERY, M. I. 1989. Hatching asynchrony in European bee-eaters *Merops apiaster*. J Anim Ecol 58: 815–835.
[21] KRÜGER, T. 2018. Importance of bumblebees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* spp.) in the diet of European Bee-eaters (*Merops apiaster*) breeding in oceanic climate. Journal of Ornithology 159: 151–164.
[22] MATOUŠEK, B. 1951. Příspěvek k biologii vlhy evropské (*Merops apiaster*) na Slovensku. Sylvia 13: 22–125.
[23] MAŘAN, J. 1958. Příspěvek k poznání potravy vlhy pestré (*Merops apaister*). Sylvia 15: 254.
[24] FUISZ, T. I. et al. 2013. Photographic survey of the prey-choice of European Bee-eaters (*Merops apiaster* Linnaeus, 1758) in Hungary at three colonies. Ornis Hungarica 21(2): 38–46.

Citizen Science within Higher Secondary Education in order to increase Personal Engagement for Biodiversity Protection

Využitie Občianskej vedy v rámci vyššieho sekundárneho vzdelávania za účelom osobnej angažovanosti žiakov pre ochranu biodiverzity

Katarína Skokanová[1]
Supervisor: Ivan Baláž[1]
[1]Katedra ekológie a environmentalistiky, FPVaI UKF, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,
katarina.skokanova@ukf.sk, ibalaz@msnet.ukf.sk

Abstract
In today's digital age, individuals routinely capture photos of nature's wonders, from insects to landscapes, using their smartphones. While these images may seem like mere personal snapshots, they hold untapped potential for scientific research. Such collective efforts could generate valuable data for monitoring biodiversity, tracking the effects of climate change, and identifying invasive species. Citizen science, a rapidly growing field, by involving students and educators in it, not only advances scientific knowledge but also public engagement and promotes biodiversity conservation. This paper explores the intersection of biodiversity education and Citizen Science (CS) within the Slovak education system, focusing on higher secondary education and in particular grammar schools. It highlights the potential of CS platforms to facilitate hands-on learning experiences. Finally, the paper suggests recommendations of specific platforms tailored to various biodiversity topics. The paper aims to contribute to the conservation and understanding of global biodiversity.

Key Words: citizen science, biodiversity, biology, higher secondary education, public engagement

Introduction

Just admit, how many photos of various insects, birds, deer, flowers, landscapes do you have on your phone? Surely, you've photo-documented, also this year, the precise arrival of storks, the departure of swallows or the blooming of cowslips or lilacs in your neighbourhood. You've probably captured the same scenes year after year. While you don't have many avenues for publishing these photos, and you're reluctant to spam your Facebook friends with them, you still find yourself unable to resist capturing photos of the fascinating things you encounter during walks in the park or forest, purely for your own enjoyment.

Imagine that these photos could still have further utility. Upon getting home, you would simply upload the photo, along with a short description, to an app and contribute to scientific research and become a citizen scientist. Imagine if 1000 such citizen scientists did the same on a single day during a specific Mapping Challenge or any monitoring initiative — what a large amount of data could be collected! Conventional research methods don't have these possibilities; however the right credibility-building strategies have to be chosen while intending the project's vision, participant recruitment and motivation [21]; [5] and the use of emerging technologies [21]; [16]. This would not only contribute to monitoring of the spread or decline of certain plant and animal species, for example due to climate change effects, but also to recording new unknown invasive species, so-called aliens [12]. And to be the first to photograph something, in a location where no one has ever seen it before, can be even more exciting.

When the data collection is carried out by citizen volunteers of different ages and professions, within the framework of some scientific research, we can talk about citizen science. Citizen science is an emerging and growing professional field of research and practice and a very flexible concept that can be adapted and applied to a variety of situations and disciplines. Citizen science utilises various platforms for the purposes of gathering or analysing data, whether they are applications with different tools or websites where data is published. Therefore, it is increasingly important to consider its potential for learning and teaching opportunities in both formal and non-formal education [3].

Our objective is to also harness the potential of school environments or other educational institutions, by involving students, and potentially their family members, and put them in the role of citizen scientists

for gathering various biodiversity related data across Slovakia through citizen science programmes.

Firstly, Students will learn much more about various plant and animal species when they see them with their own eyes, observe and examine them closely, and further relate them to other phenomena [35], but especially to environmental problems caused by human activity, resulting in a decline in biodiversity. Secondly, students will be much more motivated because they will contribute their bit to science, which is needed for change towards a better environment, and they will not feel like they are doing certain activities in school just because the teacher ordered them to do, but because it will have a greater cause. While exploring their interest in natural sciences can grow and they will be prone to be more precise with their data collection. Many studies rely on citizen scientists to collect regional data, and students can explore their neighbourhoods to a greater extent [36].

1 What is Citizen Science

Participatory science, crowd-sourced science, or citizen science (CS) uses principles of open science, is a form of open collaboration in which volunteers, who are called citizen scientists, participate in the scientific process in various ways [3], mainly in collection of various research data in relatively short periods of time, contributed by world-wide science projects [16]. Individual tasks in the citizen science projects can include: data collection, data analysis & interpretation [9], data processing [31] and dissemination of results. Dawson et al. [41] is adding that it is “a means of engaging the public with science on the scale of individual experiments, creating a unique position of combining participation, monitoring, and social change”.

Citizen science has been here for a long time, some sources say it has been since the 1700s. In the past, amateur scientists have contributed a great deal to science, particularly with networks of weather collectors and ocean monitoring. Famous names such as Alfred Russell Wallace, Thomas Edison and Gregor Mendel are all prime historical examples of citizen scientists [16]. Since the introduction of the Internet, citizen science moved its process online, thus enabling outreach and interaction with a much wider audience than ever before [10]. In this case, researchers also use the term online citizen science or digital citizen science [21], which is according to Doyle et al. [6] “an extension of citizen science, where the tasks to be completed are aided, or mediated, through the Internet. Engagement includes submitting data, providing large datasets to be analysed; making tools available to support engagement with citizen scientists that are geographically distributed; enabling communication between citizen scientists; and providing a wider reach to a broader audience.

The outcomes from citizen science projects findings in any field include advancements in scientific research, as well as increasing the public’s understanding of science or so called “science literacy” [37]. This can be key to the future career of young people who show promising aptitude, including those who may be marginalised. Particularly by facilitating lesserheard communities in having their voices towards scientific policy-making and governance [26]. Participation in citizen science has also the potential to increase volunteers’ knowledge of the field of study, such as ecology and conservation [1], [18] engagement in conservation management decisions and actions [25]; [39]; [38] and to promote positive attitudes toward nature (Evans et al. 2005). All important aspects of citizen science ensuring fairness for all parties involved are outlined in the 'Ten Principles of Citizen Science', defined by the European Citizen Science Association [14].

2 Citizen Science Platforms in the World and in Slovakia

Regarding the expansion of citizen science in Slovakia, citizen science is still in its early stages and has not that much developed systematic promotion so far. However, in June 2021, the Slovak Government approved the 'National Strategy for Open Science in Slovakia' [24] starting with the first the Open Science Action Plan 2021-2023. There are a number of Slovak citizen science projects, that are running for quite a few years already, that may not identify themselves as such because the term was not yet widely used at the time of their inception. However, Slovak citizen scientists, collaborating with universities and NGOs, primarily engage in international projects facilitated by platforms such as PlantNet, GLOBE Observer, Seek by iNaturalist, Great Nature Project, and Bioblitz. These platforms provide similar functionalities, making them “easy to use”. European users can actively choose from individual projects at websites like Eu-citizen.science, European Citizen Science Association, SciStarter, Zooniverse, National Geographic, EpiCollect or Pollinator Live that aggregate multiple projects on specific topics.

The best practices globally, selected by Roche [26], for the last two decades in education are these programmes where materials are provided for local school involvement, offering online tools for downloading data, as well as instructions for data analysis to empower participants to perform their own analysis, such as the Monarch Larva Monitoring Project [19] or Classroom FeederWatch [2]. More recent projects like LandSense [22], and eMammal [29] have mirrored the success of these large-scale schools projects.

3 Participation of Public and Schools in Citizen Science

Citizen Science is a broad and complex concept that encompasses various forms of public participation in scientific research (PPSR). PPSR focuses on engaging the public in scientific research, where citizens, students or any volunteers actively collaborate with scientists to address scientific questions, primarily through data collection. PPSR can be divided into different levels depending on the degree of participation.

PPSR is one form of Citizen Science, as CS can involve not only data collection but also activities such as environmental monitoring, various collaboration on scientific projects, and public education in the fields of science and the environment. According to [3] scientific investigations include many steps or activities in which the participants can be involved, and these are: Choosing or defining question for study; Gathering information and resources; Developing explanations (hypotheses); Designing data collection methodologies (both experimental and observational); Collecting data; Analysing data; Interpreting data and draw conclusions; Disseminating conclusions/ translate results into action and; Discussing results and asking new questions.

From an educational perspective these models differ by involving the public in the steps to varying degrees and by altering the amount of control that participants have over the different steps that according to Bonney [3] can be divided for this into three major levels:

1. **Contributory projects**, which are generally designed by scientists and for which members of the public primarily contribute data;
2. **Collaborative projects,** which are generally designed by scientists and for which members of the public contribute data but also help to refine project design, analyse data, and/or disseminate findings;
3. **Co-Created projects,** which are designed by scientists and members of the public working together and for which at least some of the public participants are actively involved in most or all aspects of the research process;

Shirk [28] divides models of the citizen science projects into these 5 categories adding two more to the three above, according to what approach is taken and what is the source of initiative for answering the research questions (outside the educational area etc.):

4. **Contractual projects,** where communities ask professional researchers to conduct a specific scientific investigation and report on the results;
5. **Collegial contributions**, where non-credentialed individuals conduct research independently with varying degrees of expected recognition by institutionalised science and/or professionals**.**

Another classification of citizen science by level of engagement is by Haklay [15], defining four levels. Level 1 (Crowdsourcing) - where the citizens act as sensors, in level 2 (Distributed Intelligence) - citizens act as basic interpreters, for level 3 (Participatory Science) where citizens participate in the problem definition and the data collection process, and level 4 (Extreme) - where the citizens partake in collaborative science, that is in all the tasks from previous levels.

Regarding the involvement of citizen science in the educational process, the cooperation may involve: research institutions, participating schools, and project coordinators offering the citizen science program from a third party. Zoellick et al. [32] argue that a third party, for example, a university, is a necessary intermediary between scientists and educators in order to ensure that specific research and educational outcomes are ultimately achieved. Therefore learning can take place in either formal or informal environments.

Informal learning environments, such as science centres, museums, botanical gardens, zoos or other outdoor settings of environmental institutions, but also specific departments specialising in awareness spreading at the university as mentioned above are crucial to science education, as citizen science projects share the same commitment to public engagement [12].

To name a few benefits of implementing SC into the teaching process can, first of all help to make the lessons more efficient and up-to-date, also thanks to using smart technologies [40]. Mobile phones that have

a digital camera with a global positioning system (GPS) are necessities of contemporary life and can be utilised as powerful observation tools in citizen science [23]. Another benefit is that when school gets outdoors with its activities to take place, students build relationships with their immediate environment, learn to work in groups with classmates, as well as teachers, and individuals in higher positions. Within CS projects incorporated into the educational process, students will be able to present their findings, for example, at conferences, thus learning presentation skills, which will contribute to building their future careers.

Schools can incorporate citizen science research into their formal education curriculum, for which school teachers will be responsible and also for carrying out mapping outside the school and ensuring result credibility in collecting the data. Teachers will have the role of citizen science intermediaries in formal learning [30], and as well as experts conducting field research with their students, and will play a crucial role in successfully integrating such projects into their classrooms and schools. Hence, specialised training for them is vital.

4 Biodiversity Challenges and its overlap with curriculum in Slovak education

Biodiversity, in abbreviated form of the term biological diversity, which encompasses the diversity of genes within species (species and subspecies), the diversity of species within ecosystems (different plants, animals, micro-organisms), and the diversity of ecosystems (different habitats such as coral reefs, forests, meadows, wetlands) within the biosphere.The diversity at these three levels together creates biodiversity. In simplified terms, it is essentially the variety of life and its forms on Earth. Therefore, it is considered an invaluable natural heritage to be protected for future generations [7].

Species extinction has always been here, it is a natural part of life here on Earth. According to BROZ [42] natural extinction represents a gradual but steady decline in the number of species. What we are currently experiencing cannot be termed as a natural extinction but characterised as an indirect extinction, caused by human progress, fishing methods, loss or degradation of habitats due to pollution, with climate change becoming an increasingly important factor. According to the European Council [43] scientists estimate that one million species of plants, insects, birds and mammals are currently threatened with extinction. And so whatever is done, or not done over the next few decades will determine how many animal and plant species, ecological communities and natural areas will survive [34].

One of the biggest challenges that today's world is facing is climate change. Paradoxically, it is a two-way process. Climate change is one of the main drivers of biodiversity loss, but destruction of ecosystems undermines nature’s ability to regulate greenhouse gas (GHG) emissions and protect against extreme weather, thus accelerating climate change and increasing vulnerability to it [33].

Scientists assume that even the bigger problem than aspects of climate change is that native species are being replaced by invasive species and their spread has consequences for reducing global biodiversity, disrupting ecosystem stability and the balance of nature [11]. Lower biological diversity contributes to global homogenization of the biosphere that will be a threat for food production, human health [20]. Monocultures without diversity tolerate changes worse and are more susceptible to diseases and pests. Only agriculture that promotes diversity can overcome all these problems. “The food system we choose has a direct impact on the kind of world and future we will have. When we lose diversity, we lose health and resilience" [13].

Given the severity of biodiversity loss due to just a few reasons stated above, it has become imperative to protect biodiversity. This need is reflected in laws and international agreements, as well as in education. One of the most important conventions in the field of biodiversity with a global scope is 'The Convention on Biological Diversity' [8] that was signed during the Rio Earth Summit 1992. The European Commission has outlined several initiatives under the Green Deal that directly relate to biodiversity conservation, such as the 'Biodiversity Strategy for 2030', which aims to halt biodiversity loss and restore ecosystems across the EU. Additionally, the 'Farm to Fork Strategy' and the 'EU Forest Strategy' include measures to promote sustainable land use and protect biodiversity.

Our attention has been focused on how the topic of biodiversity intersects with other subjects within the natural sciences. When delving a little deeper into each topic, it can be naturally complemented by various biodiversity dimensions, such as human activities and behaviour, genetics, evolution, and ecosystems [17].

The topic of Biodiversity is introduced in the lower grades subjects primarily at the level of species recognition and identification of plants and animals.

However, even in elementary education, there is potential to provide more environmental context and background. For example, emphasising the need for protection of certain species such as bees, which are essential for pollinating the food we consume daily, can enrich the understanding of biodiversity.

Since April 2022, there has been an education reform going on in primary schools in Slovakia, which also brought a change in the State Educational Program. As a result, the curriculum is no longer set for individual grades of primary education (ISCED 1) and lower secondary education (ISCED 2), but three cycles of primary education will be introduced.

In this article we will focus on higher secondary education (ISCED 3),where biodiversity intersects with topics in the educational field of "Human and Nature" (Biology, Physics, Chemistry) and in the educational field of "Human and Society" (History, Geography, Civics).

The overlap with biodiversity can also be found in various other non-traditional educational areas for this direction. Here are some example activities that can be used within these subjects: In **mathematics**: applying statistical methods to biodiversity data for species distribution studies or calculating the Biodiversity Index. In **physical education**: participate in community clean-up events to protect wildlife habitats or volunteer in gardening projects and initiatives that promote urban biodiversity. In t**echnology**-focused subjects, carry out remote sensing: using online platforms to collect and analyse biodiversity data or satellite imagery and GIS technology to monitor changes in land cover. In **economical subjects**: focus on economic benefits of Ecotourism for local communities; or calculate the economic losses associated with declining ecosystem services; or analyse financial advantages of sustainable agriculture. In **civics:** investigate environmental laws aimed at protecting biodiversity, or on the roles of government agencies and non-profit organisations in biodiversity conservation and simulate debates on summits to address global biodiversity challenges.

However, primarily biodiversity in the context of an applied focus on human actions and their impact on ecosystems, is addressed in **environmental education**. In the past, environmental education was included as one of the cross-curricular themes. Since September 2024 has been elevated to environmental literacy as part of the new national curriculum, directly included in educational areas. However, these are currently created only for primary and lower secondary education, so that's why we have decided to focus on higher secondary education.

Compared to elementary school students, we can "work" more effectively with the personality and engagement of secondary school students. According to the findings of the recent critical study "What Are You Taught in School?" conducted by the Institute of Environmental Policy in cooperation with two other ministries of SR in 2021, "there is a significant predominance in Slovakia of the perception of economic growth and increased consumption as priority goals over environmental aspects. The inefficient implementation of environmental education in schools also affects the level of environmental awareness among our students. According to the mentioned study, Slovak students demonstrate weaker performance in global issues requiring critical thinking and awareness of interconnections compared to other OECD countries. There is also a weak connection between students' theoretical knowledge and real-life situations, as well as their engagement in environmental behaviour issues"[1].

One approach that actively involves students in scientific research, engaging them in different field work [35] thereby increasing awareness and understanding of environmental issues, is citizen science. Participants can benefit from citizen science in three key ways: fostering curiosity, enhancing a deeper understanding of science, and providing an unprecedented engagement between professional scientists and the general public [6].

5 Use of Citizen Science Platforms for Teaching about Biodiversity at Grammar Schools

We have focused on the topic of biodiversity, which can be tackled using the CS methods within the 'Human and Nature' educational field, in biology specifically at grammar schools with a Four-Year and Five-Year Educational Programme, drawing from the Revised State Educational Program [27].

Tab 1.: Subject Biology

Subject Biology		
Thematic areas	Connections of the topics to biodiversity	Suitable Citizen science apps

Organisms and environment	**1 Abiotic and biotic components of habitats:** influence biodiversity in ecosystems. Environmental diversity, such as soil, climate, and water, determines which organisms can survive in a given location.	**FreshWater Watch** (health of freshwater ecosystems), **Climatewatch** (temperatures, humidity and seasonal changes) **Today I breathe** (measuring CO2 concentrations)
	2 Functions of organisms in ecosystems: etc. Bioindicators are an important tool for monitoring biodiversity and ecosystem health.	**The Liquencity**·2 (using bioindicator lichen species to assess air quality in cities)
	3 Food chains of organisms: determine interactions of species and their mutual dependencies. The decrease of one species has gradual effects on other species and the environment as a whole.	**European ladybirds (**Data collection on ladybird species revealed the presence of parasitic fungus that lives on ladybirds)
	4 Adaptation of organisms in nature and to life with humans: Adaptations of cosmopolitan and synanthropic organisms to various environments and conditions are an important factor contributing to species diversity in nature..	**Program Bocian (**reporting presence of white stork in villages in Slovakia) **City Nature Challenge** (document urban biodiversity)
World of Plants and Fungi	**1 Morphological characteristics of plants and fungi:** The properties of plants and the diversity of their structures are unique to each species and help determine their functions in ecosystems.	**Mushroom Observer** (observation and identification of mushrooms and fungi), **Pl@ntNet (**identifying plants using photos compare
	2 Pollination and fertilisation: These processes promote genetic variability and ensure the survival of plants. However, due to climate change, habitat loss, and diseases, ecosystem relationships are disrupted, increasing the risk of extinction for endangered species.	**Project Bumble Bee Watch (**tracking of pollination and fertilisation, through monitoring the activities of pollinating insects) **Nature's Notebook** (seasonal changes in plants/animals by recording flowering, fruiting, migration
		patterns to track climate change)
World of animals	**1 Morphological features of invertebrates and vertebrates**: Comparing morphological traits helps understand their evolutionary development and adaptations to various environments.	**Project Noah** (observations of wildlife animals), **Animal Sound Archive** (digital library of animal vocalisations and sounds)* **eBird** (database of bird observations, record sightings of wild birds)
	2 Conditions of livestock farming: they influence the genetic diversity of livestock species, as well as their impact on the environment and other species in the ecosystem.	**Agrimetrics** (optimising farming and food production practices through analysis and decision-making tools*
Human Biology and Healthy Lifestyle	**1 Alternative nutrition, weekly meal plan:** These topics relate to human nutrition, but the concept of biodiversity can be applied when discussing the variety of foods and diets across different cultures and communities.	**Open Food Facts** (database of food product ingredients from different countries, read by barcodes)* **E-Numbers** (identifying presence of chemical substance in food and their potential effects on health)*
	2 Immunity, civilization, and infectious diseases: Their connection to biodiversity is mostly indirect, but we can discuss the impact on health and resilience of organisms against diseases.	**Open Humans** (contribute personal health data to various research projects, related to disease diagnosis, prevention, treatment)
Genetics	**1 Genetic variation, inheritance patterns:** by understanding them we gain insights into the diversity of traits within and between species. Genetic principles are crucial for comprehending biodiversity at the molecular level.	**The INCREASE project** (conservation of genetic resources on food legumes to develop novel varieties for healthier food production with exchange of seeds via a mobile app)*
	2 Gene mutations: can lead to loss of genetic diversity, increasing the vulnerability of	**EteRNA project** (contributing to scientific research by playing the game to

	organisms and sustainable environments. Reducing mutagenic factors can protect biodiversity from potential threats.	design RNA molecules)
	3 GMOs and their impact on humans: Research can reveal how GMOs can interact with wild populations and influence native flora and fauna, helping to identify risks and take measures to protect biodiversity and its sustainability.	**GMO Plant Detectives UK (**investigating the impact of GM plants on humans and food quality)*

*These platforms may still contribute to scientific knowledge or education but do not involve public participation in scientific research activities as they function as databases.

Discussion

One crucial topic up for discussion is that, teachers at primary and secondary schools face limitations such as curriculum constraints and logistical challenges when considering engagement in citizen science for teaching biodiversity, creating a growing need to address these issues and prepare teacher training as part of undergraduate education at universities. Many educators express interest in integrating citizen science projects into their teaching, yet navigating the multitude of available initiatives can be daunting [26]. To address this, efforts are needed to provide clarity, motivation, and a database of best practices and project contacts, empowering educators to select and implement suitable citizen science projects in their classrooms. One option is to include these trainings within teacher training of environmental education courses at universities.

Conclusions

In conclusion, the integration of citizen science (CS) into educational settings holds tremendous potential for fostering scientific literacy, engaging students in real-world research, and promoting environmental stewardship. By leveraging CS platforms, students can actively contribute to scientific endeavours, deepen their understanding of biodiversity, and develop essential skills for the future. As citizen science continues to evolve and gain recognition, its role in education is poised to expand, offering new opportunities for collaborative learning and environmental action.

Sources

[1] Bodáczová, M., M. Engeľ, and M. Sedláček. "Čo vás v tej škole učia." Analýza stavu formálneho environmentálneho vzdelávania na Slovensku. Bratislava: Inštitút environ- -mentálnej politiky (2021).. https://www.minzp.sk/files/iep/2021_03_co_vas_v_tej_skole_ucia.pdf

[2] Bonney, R., and Dhondt, A. A. (1997). "FeederWatch. An example of a student- scientist partnership," in Internet Links for Science Education. Innovations in Science Education and Technology, Vol. 4, ed C. K. Cohen (New York, NY; London: Plenum Press), 31–53. doi: 10.1007/978-1-4615-5909-2

[3] Bonney, R.; Ballard, H.; Jordan, R.; McCallie, E.; Phillips, T.; Shirk, J.; Wilderman, C.C. Public Participation in Scientific Research: Defining the Field and Assessing Its Potential for Informal Science Education. A CAISE Inquiry Group Report; Center for Advancement of Informal Science Education: Washington, USA, 2009.

[4] Brossard, D., Lewenstein, B. and Bonney, R. 2005. Scientific knowledge and attitude change: The impact of a citizen science project. International Journal of Science Education, 27(9): 1099–1121.

[5] Buesching, C. D., Newman, C., & Macdonald, D. W. (2014). How dear are deer volunteers: the efficiency of monitoring deer using teams of volunteers to conduct pellet group counts. *Oryx, 48*, 593–601.

[6] Cathal Doyle, Rodreck David, Yevgeniya Li, Markus LuczakRoesch, Dayle Anderson and Cameron M. Pierson. 2019. Using the Web for Science in the Classroom: Online Citizen Science Participation in Teaching and Learning. In WebSci'19: 11th ACM Conference on Web Science, June 30-July 3, 2019, Boston, MA, USA. ACM, New York, NY, USA, 10 pages. https://doi.org/10.1145/3292522.3326022

[7] Cesco, S.; Zara, V.; De Toni, A.F.; Lugli, P.; Evans, A.; Orzes, G. The future challenges of scientific and technical higher education. *Tuning J. High. Educ.* 2021, *8*, 85–117.

[8] Convention on Biological Diversity' (CBD). Available at: www.cbd.int

[9] Crowston, K., Mitchell, E. and Østerlund, C., 2019. Coordinating Advanced Crowd Work: Extending Citizen Science. *Citizen Science: Theory and Practice*, 4(1), p.16.DOI: https://doi.org/10.5334/cstp.166

[10] Curtis, V. 2014. Online citizen science games: opportunities for the biological sciences. Applied & translational genomics, 3(4)

[11] Daehler, C. C. (2003). Performance comparisons of co-occurring native and alien invasive plants: implications for conservation and restoration. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 34(1)

[12] Dickinson, J.L., Zuckerberg, B. and Bonter, D.N. 2010. Citizen science as an ecological research tool: Challenges and benefits. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 41: 149–172.

[13] Eat Responsibly, 2018.available at: https://www.eatresponsibly.eu/sk/biodiversity/6#section-banker
[14] European Citizen Science Association (2015). Ten Principles of Citizen Science challenges and ensuring the inclusion of all participants, defined by the https://www.ecsa.ngo/2016/05/17/10-principles-of-citizen-science/
[15] Haklay, M. (2013). Citizen Science and Volunteered Geographic Information: Overview and Typology of Participation. In: Sui, D., Elwood, S., Goodchild, M. (eds) Crowdsourcing Geographic Knowledge. Springer, Dordrecht. DOI: ttps://doi.org/10.1007/978-94-007-4587-2_7
[16] Chandler, M. et al. (2017). Involving Citizen Scientists in Biodiversity Observation. In: Walters, M., Scholes, R. (eds) The GEO Handbook on Biodiversity Observation Networks. Springer, Cham. ttps://doi.org/10.1007/978-3-319-27288-7_9
[17] Id Babou, A.; Selmaoui, S.; Alami, A.; Benjelloun, N.; Zaki, M. Teaching Biodiversity: Towards a Sustainable and Engaged Education. Educ. Sci. 2023, 13, 931. https:// doi.org/10.3390/educsci13090931
[18] Jordan, R.C., Gray, S.A., Howe, D.V., Brooks, W.R. and Ehrenfeld, J.G. 2011. Knowledge gain and behavioural change in citizen-science programs. Conservation Biology, 25(6): 1148–1154. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01745.x
[19] Kountoupes, D. L., and Oberhauser, K. S. (2008). Citizen science and youth audiences: educational outcomes of the Monarch Larva Monitoring Project. J. Commun. Engag.https://digitalcommons.northgeorgia.edu/jces/vol1/iss1/5
[20] McKinney, M. L. & Lockwood, J. L. (1999). Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. Trends Ecol. Evol.14:
[21] Nov, O., O. Arazy, and D. Anderson. 2011. Dusting for science: motivation and participation of digital citizen science volunteers. In Proceedings of the 2011 iConference. ACM, 68-74.
[22] Olteanu-Raimond, A. M., Jolivet, L., Van Damme, M. D., Royer, T., Fraval, L., See, L., et al. (2018). An experimental framework for integrating citizen and community science into land cover, land use, and land change detection processes in a National Mapping Agency. Land 7:103. doi: 10.3390/land7030103
[23] Osawa T (2018). A crowdsourcing approach to collecting photo-based insect and plant observation records. Version 1.4. National Institute of Genetics, ROIS. Occurrence dataset
[24] Otvorenaveda.cvtisr.sk, 2023. The Slovak Government approved the National Strategy for Open Science in Slovakia. Available at: https://otvorenaveda.cvtisr.sk/
[25] Pattengill-Semmens, C. V., and B. X. Semmens. 2003. Conservation and management applications of the REEF volunteer fish monitoring program. Environmental Monitoring and Assessment 81(1–3):43–50. http://dx.doi.org/10.1023/A:1021300302208
[26] Roche J, Bell L, Galvão C, Golumbic YN, Kloetzer L, Knoben N, Laakso M, Lorke J, Mannion G, Massetti L, Mauchline A, Pata K, Ruck A, Taraba P and Winter S (2020) Citizen Science, Education, and Learning: Challenges and Opportunities. Front. Sociol. 5:613814.
[27] ŠPÚ. ŠVP. Inovovaný Štátny vzdelávací program . Inovovaný ŠVP pre gymnáziá so štvorročným a päťročným vzdelávacím programom. Available at: ttps://www.statpedu.sk/files/articles/dokumenty/inovovany-statny-vzdelavaci-program/biologia_g_4_5_r.pdf
[28] Shirk, J. L., H. L. Ballard, C. C. Wilderman, T. Phillips, A. Wiggins, R. Jordan, E. McCallie, M. Minarchek, B. V. Lewenstein, M. E. Krasny, and R. Bonney. 2012. Public participation in scientific research: a framework for deliberate design. Ecology and Society 17(2): http://dx.doi.org/10.5751/ES-04705-170229 In this document - outcomes are interesting
[29] Schuttler, S. G., Sears, R. S., Orendain, I., Khot, R., Rubenstein, D., Rubenstein, N., et al. (2019). Citizen science in schools: students collect valuable mammal data for science, conservation, and community engagement. Bioscience 69, 69–79. doi: 10.1093/biosci/biy141
[30] Weinstein, M. (2012). Schools/citizen science. A response to “the future of citizen science”. Democr. Educ. 20:6.
[31] Yadav, P. and J. Darlington. 2017. Conceptual Frameworks for Building Online Citizen Science Projects. arXiv preprint arXiv:1704.05084.
[32] Zoellick, B., Nelson, S. J., and Schauffler, M. (2012). Participatory science and education: bringing both views into focus. Front. Ecol. Environ. 10, 310–313. doi: 10.1890/110277
[33] Horizon Magazine, 2024. “Climate change and biodiversity loss should be tackled together," The EU Research & Innovation magazine. Available at: https://projects.research-and-innovation.ec.europa.eu/en/horizon-magazine/climate-change-and-biodiversity-loss-should-be-tackled-together
[34] Primack, Richard B., Pavel Kindlmann, and Jana Jersáková. Úvod do biologie ochrany přírody. PORTÁL sro, 2011.
[35] Zhang, Elizabeth Y., et al. "Learning by doing: A multi-level analysis of the impact of citizen science education." Science Education 107.5 (2023): 1324-1351.
[36] SLTR.com. Science Lessons That Rock, 2022. Citizen Science Projects. Science Lessons That Rock. https://sciencelessonsthatrock.com/citizen-science-projects-html/
[37] Crall, A. W., Jordan, R., Holfelder, K., Newman, G. J., Graham, J., & Waller, D. M. (2013). The impacts of an invasive species citizen science training program on

participant attitudes, behavior, and science literacy. Public understanding of Science, 22(6), 745-764.
[38] Lewandowski, E., Caldwell, W., Elmquist, D. and Oberhauser, K., 2017. Public Perceptions of Citizen Science. Citizen Science: Theory and Practice, 2(1), p.3.DOI: https://doi.org/10.5334/cstp.77
[39] Cooper, C. (2016). Citizen science: How ordinary people are changing the face of discovery. Abrams.
[40] Newman, G., Wiggins, A., Crall, A., Graham, E., Newman, S., & Crowston, K. (2012). The future of citizen science: emerging technologies and shifting paradigms. Frontiers in Ecology and the Environment, 10(6), 298-304.
[41] Dawson T., Hambly J., Kelley A., Lees W., Miller S. (2020). Coastal heritage, global climate change, public engagement, and citizen science. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 117, 8280–8286. 10.1073/pnas.1912246117
[42] BROZ, 2023. GameOn. Strata biodiverzity - vymieranie druhov. Čo s tým? https://gameon.broz.sk/strata-biodiverzity-vymieranie-druhov-co-s-tym/
[43] Council of the European Union, 2023. Consilium. Biodiversity: how the EU protects nature https://www.consilium.europa.eu/en/policies/biodiversity/

Analýza správania rýchleho hádania v Priscille

Analysis of rapid-guessing behavior in Priscilla

Matúš Valko[1]
Školiteľ: Ján Skalka[1]
[1]Katedra informatiky, FPVaI UKF, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra,
matus.valko@ukf.sk, jskalka@ukf.sk

Abstrakt
Článok sa zaoberá identifikáciou charakteristík správania študentov v online vzdelávacom prostredí. Konkrétne ide o špecifický druh správania, pri ktorom testujúci odpovedajú na otázky rýchlo, bez toho, aby si ich prečítali alebo premysleli. Toto správanie sa označuje ako Rapid-Guessing Behaviour (RGB), čiže správanie zamerané na rýchle hádanie odpovedi. V článku popisujeme rôzne aspekty, napr. príčiny RGB, následky ako aj metódy na zistenie časového prahu stanovujúceho rozdiel medzi RGB a akceptovateľným správaním. Na identifikáciu časového prahu porovnáme existujúce metódy a pre ďalšie skúmanie vyberieme najvhodnejšiu z nich.
Kľúčové slová: RGB, doba odozvy, motivácia, časový prah

Abstract
The article focuses on identifying behavioral characteristics of students in an online learning environment. Specifically, it examines a specific type of behavior where test-takers answer questions quickly without reading or thinking about them. This behavior is referred to as Rapid-Guessing Behavior (RGB). The article describes various aspects of RGB, such as its causes, consequences, and methods for detecting the time threshold that distinguishes RGB from acceptable behavior. We will compare existing methods for identifying the time threshold and select the most suitable one for further research.
Key Words: RGB, response time, motivation, threshold

Úvod

Správanie zamerané na rýchle hádanie je fenomén, ktorý sa vyskytuje v rôznych testovacích kontextoch. Ide o typ správania, pri ktorom testujúci odpovedajú na otázky rýchlo, bez toho, aby si ich prečítali alebo premysleli. Toto správanie môže mať rôzne príčiny, ako napríklad:

- **Nedostatok času a úzkosť:** Nedostatok času na zodpovedanie všetkých otázok môže spôsobiť úzkostne na testujúcich a preto sa snažia test rýchlo dokončiť.
- **Nízka motivácia:** Testujúci nemusia byť motivovaní k tomu, aby test urobili čo najlepšie.
- **Nedostatok znalostí:** Nepripravenosť a nedostatok znalostí u testujúcich spôsobuje nesprávne odpovedanie na otázkach.

Testujúci, ktorí rýchlo hádajú, s najväčšou pravdepodobnosťou robia chyby. Nedostatok času a úzkosť môžu byť zapríčinené zle navrhnutými otázkami, či malým časovým limitom. Nedostatok znalostí závisí predovšetkým na schopnostiach testujúceho, ale významnú rolu hrá i motivácia. Viacero štúdií zistilo, že vyššia motivácia testujúcich vplýva kladne na ich výsledky.

Hlavným cieľom výskumu je porovnanie určitých metód na zistenie časového prahu, ktorý by najlepšie rozdeľoval správanie zamerané na hádanie odpovede a správanie zamerané na riešenie úlohy.

V ďalšej kapitole si povieme o hlavných východiskách výskumu RGB a ako súvisí motivácia pri testovaní. V druhej kapitole ukazujeme rôzne metódy na zistenie prahu, ktorý rozdeľuje dva typy správania sa testujúcich v testoch. V tretej kapitole je navrhnutá metodológia práce a jej výsledky. Záver a zistené výsledky diskutujeme vo štvrtej kapitole.

1 Motivácia pri testovaní

Výskum RGB má dve hlavné východiská, z ktorých každé predstavuje inovatívny spôsob riešenia konkrétneho problému merania [1]. Prvé východisko pre výskum RGB bola práca od autorky Schnipke [2], ktorá vo svojej dizertačnej práci skúmala hodnotenie rýchlosti testov, ktoré mali veľký vplyv na výsledné skóre. Zistila, že v časovom teste niektorí kandidáti rýchlo vyplnili odpovede na zvyšné otázky, zrejme v nádeji, že niektoré z nich uhádnu správne. Toto správanie sa vyskytovalo u kandidátov pri posledných otázkach, kde nemali toľko času na prečítanie si otázky alebo odpovede.

Pre týchto testovaných by sa mal test považovať za príliš rýchly, pretože ak by mali dostatok času prečítať a dôkladne zvážiť každú otázku, pravdepodobne by sa takto nesprávali. Tradičné ukazovatele rýchlosti testov, však toto rýchle hádanie nezachytili. Autorka Schnipke [2] predpokladala, že doba odozvy (item response time) na položku (úlohu) by mohla byť účinnejším spôsobom hodnotenia rýchlosti testov. Navrhla klasifikovať každú odpoveď na úlohu ako indikátor jedného z dvoch typov správania sa:

1. **Rýchle hádanie:** Pri tomto správaní testovaný rýchlo odpovedá na úlohy, keď sa blíži koniec času. Presnosť bude na úrovni náhody alebo blízko nej, pretože testovaný nemá dostatok času na premyslenie. Testovaný môže úlohu rýchlo preletieť očami a hľadať kľúčové slová, ale pri rýchlom hádaní si ju neprečíta celú.
2. **Riešenie úlohy:** Testovaný si pozorne prečíta úlohu, dôkladne zváži odpoveď a aktívne sa snaží určiť správnu odpoveď na každú úlohu. Presnosť bude závisieť od náročnosti a ďalších charakteristík úlohy, ako aj od schopností testovaného.

Druhý východiskový bod prišiel o niekoľko rokov neskôr, kde v štúdií riešili problém nízkeho úsilia pri testovaní všeobecného vzdelávania na univerzite. Sledované úlohy boli podávané v počítačových testoch (computer based test - CBT) a neboli striktne časovo obmedzené. Testovanie prebiehalo v špeciálnom režime mimo bežnej výučby a pre testovaných nemali žiadne dôsledky na skóre alebo hodnotenie. Analýza dát z CBT potvrdila, že správanie zamerané na rýchle hádanie sa preukázalo aj na nízko motivovaných testujúcich.

Na základe týchto zistení boli vyvinuté nové metódy testovania [1]:

- metódy na meranie úsilia testujúcich a úsilia na položkách (úlohách) [3, 4],
- metódu na úpravu skóre s ohľadom na vplyv rýchleho hádania [5],
- počítačový test, ktorý dokáže v reálnom čase detekovať, kedy testovaný začne prejavovať rýchle hádanie, a pokúsiť sa tomuto správaniu predísť zobrazením povzbudzujúcich alebo varujúcich správ [6].

Existujú teda dve odlišné línie výskumu správania rýchleho hádania. Jedna sa zameriavala na správanie testovaných v testoch s vysokou záťažou, zatiaľ čo druhá sa zameriavala na testy s veľkým časovým limitom a nízkou záťažou. V prvom prípade odráža RGB strategickú voľbu testovaných, ktorí sa snažia maximalizovať svoje skóre. V druhom prípade signalizuje rýchle hádanie u testovaných, ktorí sa nesnažia maximalizovať svoj výkon. To znamená, že rovnaké správanie testovaného môže mať dva úplne odlišné dôvody a interpretácie.

Hoci tieto spomenuté štúdie nepriniesli postupy ako zvýšiť motiváciu u testujúcich, ale preukázali, že motivácia súvisí s výkonom testujúcich [7]. Viaceré štúdie sa zaoberali ako zvýšiť motiváciu a preto existuje viacero spôsobov ako ju zvýšiť. Gamifikácia úloh, učenie sa s pomocou video materiálov a využívanie interaktívnych aktivít v e-learningu sú možné spôsoby, ako zvýšiť motiváciu u testujúcich [8, 10, 12, 14].
Študenti, ktorí nie sú motivovaní vydať výkon na testoch s nízkou váhou, môže viesť k tomu, že žiaci nebudú pristupovať k testom s vážnosťou, a teda nepreukážu svoje skutočné vedomosti [3, 9].

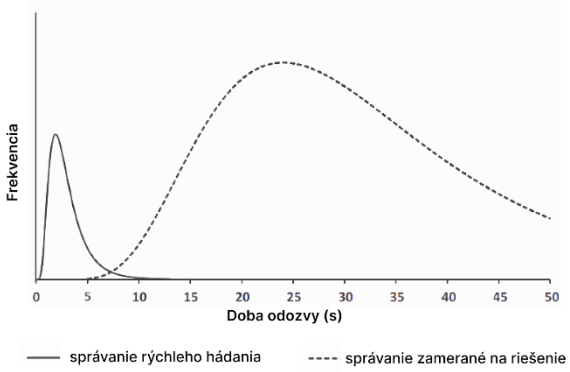
2 Metódy na zistenie prahu pri RGB

Čas, ktorý testovaní venujú odpovedi na danú položku - úlohu, sa líši. Dôvodom sú individuálne rozdiely v rôznych faktoroch, ako je úroveň dosiahnutých vedomostí, rýchlosť čítania, kognitívna rýchlosť alebo únava. Okrem toho existujú aj ďalšie situačné faktory, ktoré môžu ovplyvniť dobu odozvy (napríklad rušivý hluk). Tieto početné vplyvy sťažujú jednoznačné vysvetlenie, prečo jeden testovaný odpovedal na položku za 30 sekúnd, zatiaľ čo iný potreboval 35 sekúnd. Ak k odpovedi dôjde rýchlo – tým myslíme oveľa rýchlejšie, ako je čas potrebný na prečítanie, pochopenie a výber odpovede testovaným – možno s istotou usúdiť, že testovaný sa s položkou nezaoberal dôkladne. Takéto neodôvodnené odpovede odrážajú iný proces odpovedania, ako ten, ktorý sa používa pri zaujatom testovanom, a neposkytujú informácie o úrovni jeho vedomostí [1, 2, 11].

Bolo navrhnutých niekoľko metód na výber časových prahov pre identifikáciu správania rýchleho hádania. Tieto metódy využívajú rôzne informácie o charakteristikách testových položiek a odpovediach na tieto položky. Hoci sa tieto metódy zvyčajne používajú samostatne, niekedy sa aj kombinujú.

Vizuálna kontrola rozdelenia doby odozvy: niektoré štúdie sa pri určovaní prahu pre položku spoliehali na vizuálnu kontrolu rozdelenia pozorovanej doby odozvy. Pri tejto metóde sa snažíme identifikovať „pokles“ v skoršej časti rozdelenia. Tento pokles pravdepodobne naznačuje bod, v ktorom sa pretínajú rozdelenia doby odozvy pre správanie rýchleho hádania a správanie

zamerané na riešenie úlohy. Na Obrázku 1 sa napríklad takýto pokles vyskytuje okolo 7 sekúnd. Túto metódu následne použilo mnoho ďalších štúdií [2, 4, 5, 7, 13].



Obr. 1 Rozdelenia časov odozvy pre správanie rýchleho hádania a správania zameraného na riešenie úloh
Zdroj: [1]

Povrchová charakteristika: Logický prístup je stanovenie časového prahu na základe počtu znakov v texte položky, či úloha obsahuje tabuľky alebo obrázky alebo, či sa daná informácia poskytuje prvýkrát. Dôvodom bolo, že s rastúcou dĺžkou položky a obťažnosťou položky rastie aj latencia odpovede [15]. Táto metóda sa nespolieha na skutočné údaje o tom, ako dlho trvalo zodpovedanie podobných otázok [3, 4].

Niektoré štúdie použili dynamické prahy (3, 5 a 10 sekúnd), ktoré sú závislé od počtu znakov [3, 16]. Menší počet prahov môže viesť k nesprávnemu odhadnutiu správania sa u testujúcich, a preto počítanie prahu u každej úlohy zvlášť, by zabezpečilo optimálny prístup pri rôznorodých úlohách.

Spoločné prahy k-sekúnd: Niektoré výskumy používali pre všetky položky spoločný časový prah (zvyčajne 3 až 5 sekúnd). Ide o najjednoduchšiu metódu prahových hodnôt, pretože nevyžaduje informácie o povrchových charakteristikách jednotlivých položiek ani o rozdeleniach doby odozvy. Táto metóda je užitočná a ľahko implementovateľná metóda pri veľkých množstvách úloh. Nevýhodou metódy je, že univerzálnosť tejto metódy často vedie k rozdielom v chybách klasifikácie medzi jednotlivými položkami [16, 17].

Kombinované modely: Niekoľko štúdií využilo na modelovanie správania sa pri rýchlom hádaní a riešení úloh kombinácie distribučných modelov [18, 19]. Tieto metódy vyberajú časové prahy zodpovedajúce odhadovanému bodu prieniku medzi distribúciami doby odozvy pre obe správania. Podobne ako pri prístupoch vizuálnej kontroly, aj tieto prahy povedú k chybám klasifikácie.

Kombinácia doby odozvy a presnosti (normatívny prah): Metódy na identifikáciu prahových hodnôt pre RGB, ktoré navrhli autori Wise a Ma [20], spájajú dobu odozvy s presnosťou odpovedí. Tieto metódy vychádzajú z myšlienky, že rýchle hádania sú zvyčajne oveľa menej presné ako premyslené odpovede. Výhodou tejto normatívnej prahovej metódy je, že sa dá ľahko aplikovať na väčšie banky úloh, pretože na výpočet prahov je potrebná iba priemerná doba odozvy pre každú položku [1] .

Navrhnutých bolo niekoľko ďalších metód na identifikáciu prahových hodnôt, ktoré kombinujú dobu odozvy s presnosťou. Tieto metódy hľadajú bod, v ktorom presnosť presiahne úroveň očakávanú pri náhodnom hádaní [21, 22]. Každá z metód využíva logiku, ktorá s minimálnymi chybami identifikuje správanie zamerané na riešenie úlohy. Hlavnou nevýhodou týchto metód je však to, že na presné zistenie nárastu presnosti potrebného na identifikáciu prahu sa vyžaduje značné množstvo údajov o odozve na položku.

Pri identifikácii správania rýchleho hádania bolo navrhnutých niekoľko metód na stanovenie prahových hodnôt. Porovnania týchto metód ukázali, že vedú k podobným výsledkom [16]. Avšak, existujú medzi nimi určité rozdiely, ako napríklad v úspešnosti klasifikácie výskytov.

3 Metodológia a výsledky

Táto kapitola prezentuje postup a výsledky analýzy metód na zistenie prahu pri správaní rýchleho hľadania. Vyberieme štyri najčastejšie používané metódy (vizuálna kontrola, povrchová charakteristika, spoločný prah a normatívny prah) na zistenie časového prahu a pokúsime sa identifikovať RGB vo virtuálnom prostredí Priscilla. Vybrané metódy budú porovnané a vyberieme najvhodnejšiu metódu, ktorá najlepšie zachytáva správanie zamerané na rýchle hádanie odpovedi v online prostredí.

3.1 Metodológia

Na výskum sme použili dáta z kurzu programovania v jazyku Python (od 2021 do 2023), keďže obsahuje najviac úloh s jednou alebo viacerými správnymi odpoveďami. Testovaní sú väčšinou študenti prvého ročníka bakalárskeho štúdia, ktorí musia splniť všetky úlohy v kurze na získanie známky. Keďže záznamy o samostatných úlohách nepostačujú na dôkladnú analýzu, tak je vhodnejšie skúmať úlohy ako celok. Úlohy v daných skupinách by sa nemali značne líšiť v

otázkach a odpovediach a preto ich rozdelíme do dvoch skupín:

1. **Úlohy s jednou správnou odpoveďou,**
2. **Úlohy s viacerými správnymi odpoveďami.**

Na zistenie časových prahov skupín úloh použijeme štyri najčastejšie používané metódy:

- Vizuálna kontrola rozdelenia doby odozvy, pozretím na graf doby odozvy a ich frekvencií určíme časový prah. Časový prah sa nachádza v bode, v ktorom sa pretínajú dve rozdelenia (správanie zamerané na rýchle hádanie a správanie zamerané na riešenie úlohy).
- Spoločný prah, najjednoduchšia metóda, kde pre všetky úlohy je rovnaký časový prah. V našom prípade použijeme trojsekundový prah, ktorý bol porovnávaný v práci od autorov Kong, Wise a Bhola [16].
- Povrchovú charakteristiku – časový prah sa určuje podľa na základe počtu znakov v texte otázky a odpovede. Rozsahy časov použijeme také ako zo štúdie od autorov Wise a Kong [3]. Pre úlohy s 200 a menej znakmi určili 3 sekundy, od 200 do 1000 znakov určili 5 sekúnd a od 1000 znakov určili 10 sekundový časový prah.
- Normatívnu metódu – časový prah sa určuje podľa priemeru časov odozvy. Autori Wise a Ma [20] porovnávali v práci časové prahy a zistili, že najspoľahlivejší časový prah je 10% z priemeru časov odozvy.

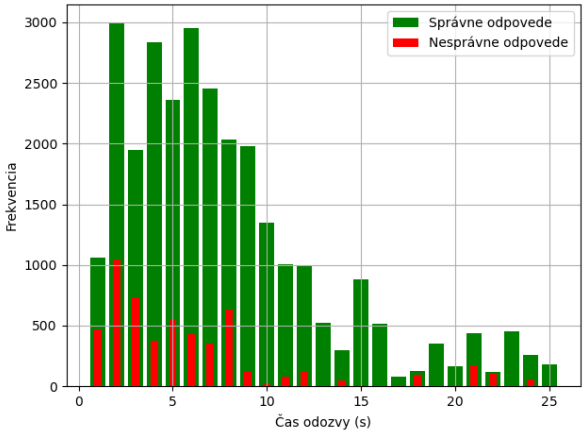
Získané časové prahy budeme analyzovať na základe presnosti odpovedí. V ideálnom prípade by mala byť presnosť nízka pri správaní zameranom na rýchle hádanie a vysoká pri správaní zameranom na riešenie úlohy. Čiže hľadáme na akom prahu bude najväčší rozdiel miery presnosti v správaniach.

3.2 Výsledky

Ako prvú skupinu, ktorú budeme analyzovať bude skupina úloh s jednou správnou odpoveďou.

Z Obrázka 2 je možné pozorovať vysoký počet nízkych časov odozvy hneď po začatí úlohy. Krátke časy odozvy nie sú nezvyčajné pre úlohy s jednou správnou odpoveďou, ale môže to naznačovať to, že sa jedná o študentov, ktorý podliehali správaniu rýchleho hádania. Avšak tieto skoré odpovedania vykazujú vysokú úspešnosť správneho odpovedania pri jednotlivých úlohách. Pri správaní zameraného na rýchle hádanie je známe, že miera presnosti odpovede je podobná ako pri zodpovedaní náhodnej odpovede [1, 20, 23].

Keďže úlohy s jednou správnou odpoveďou sú väčšinou jednoduchého typu (odpoveď je buď *Pravda* alebo *Nepravda),* tak miera presnosti odpovede pri náhodnom odpovedaní by mala byť 50%. Miera presnosti testujúcich na prvej sekunde je 70%, čo nám priamo nenaznačuje, že sa tu nachádzajú testujúci so správaním zameraným na rýchle hádanie odpovede. Podobne ako na druhej a tretej sekunde času odozvy, kde majú mieru presnosti 74% a 73% a až na štvrtej sekunde je prudký nárast na 88%. Preto určujeme časový prah z vizuálneho hľadiska na 3 sekundy.



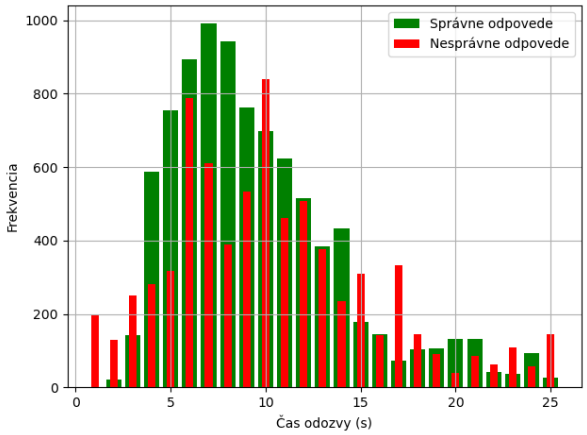
Obr. 2 Rozdelenia časov odozvy a ich frekvencia na úlohách s jednou správnou odpoveďou

Keď sa pozrieme na charakteristiku úloh, tak podľa počtu znakov v úlohe, by sme mali mať presnejší prah ako pri vizuálnej kontrole. Pri úlohách s jednou správnou odpoveďou sme zistili, že priemerný počet znakov v úlohe je 105. Keďže to je menej ako 200 znakov, tak časový prah z povrchovej charakteristiky určíme na 3 sekundy.

Ako poslednú metódu použijeme normatívnu metódu. Táto metóda sa spolieha na reálne časy odozvy namiesto charakteristík úloh. Na zistenie prahu sme vypočítali priemerný čas odozvy na úlohách a vybrali sme 10% z priemeru. Časový prah nám vyšiel na 0,9 sekundy.

Pri druhej skupine úloh je vidieť neznačný rozdiel celkového rozdelenia časov odozvy (Obr. 3) oproti predchádzajúcej skupine (Obr. 2). Na druhú stranu, početnosť nesprávnych odpovedí je oveľa väčšia, čo nám svedčí o tom, že úlohy tohto typu sú náročnejšie. Pri vizuálnej kontrole Obrázka 3 nie je jasne vidieť či určití študenti podliehali správaniu rýchleho hádania. Keď sa pozrieme na mieru presnosti odpovedí tak značný nárast na 68% sa nachádza na štvrtej sekunde.

Preto tiež určujeme časový prah z vizuálneho hľadiska na 3 sekundy.



Obr. 3 Rozdelenia časov odozvy a ich frekvencia na úlohách s viacerými správnymi odpoveďami

Druhá skúmaná skupina úloh má väčší počet znakov už len preto, že obsahujú viacero možností na odpovedanie. Priemerná dĺžka úloh s viacerými správnymi odpoveďami je 367 znakov. Keďže je to viacej ako 200 a menej ako 1000 znakov, tak časový prah určujeme na 5 sekúnd.

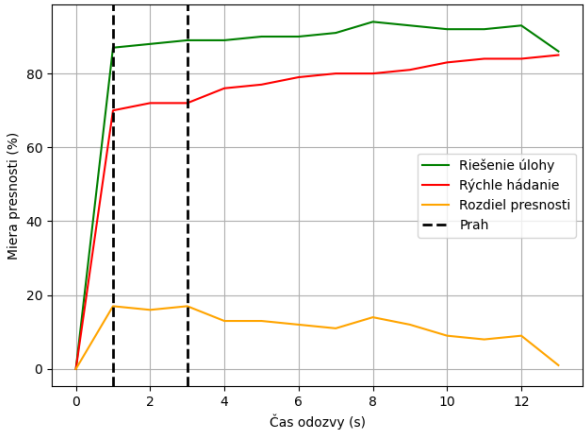
Priemerný čas odozvy na úlohách s viacerými správnymi odpoveďami je 15 sekúnd. Časový prah normatívnej metódy určíme na 1,5 sekundy.

Tab. 1 Časové prahy skúmaných metód na skupinách úloh

	Prvá skupina	Druhá skupina
Vizuálna kontrola	3 s	3 s
Spoločný prah	3 s	3 s
Povrchová charakteristika	3 s	5 s
Normatívna metóda	0,9 s	1,5 s

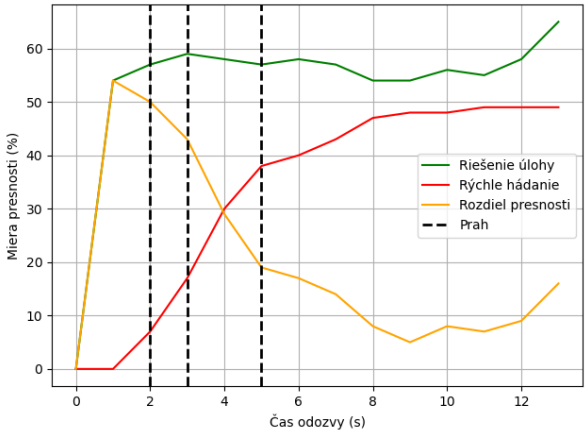
Keďže online prostredie, kde prebieha testovanie, zaokrúhľuje čas smerom hore, taktiež sme získané normatívne prahy zaokrúhlili smerom nahor (Prvá skupina = 1s, Druhá skupina = 2s).

Pri prvej skupine porovnávame iba 2 prahy (Obr. 4). Zhodou náhod je najväčší rozdiel miery presnosti (18%) medzi dvomi správaniami rovnaký na 3 a 1 sekundovom prahu.



Obr. 4 Rozdelenie miery presnosti pre časové prahy skupiny s jednou správnou odpoveďou

Pri druhej skupine úloh máme 2, 3 a 5 sekundové prahy (Obr. 5). Najväčší rozdiel je na 2 sekundovom prahu (50%), ďalej je na 3 sekundovom (43%) a najmenší rozdiel z vybratých prahov je na piatej sekunde(19%).



Obr. 5 Rozdelenie miery presnosti pre časové prahy skupiny s viacerými správnymi odpoveďami

4 Diskusia a záver

Získané prahy (Tab. 1) nám ukázali rozdielnosť v skúmaných metódach. Pri skupine úloh s jednou správnou odpoveďou sme získali iba 2 rozličné prahy (1s a 3s), ktoré podľa Obrázka 4 majú rovnaký rozdiel mier presnosti (18%). Tieto prahy majú rovnaký rozdiel miery presnosti ale to neznamená, že obidva prahy sú správne. Ako aj v Obrázku 1, distribúcie časov správaní sa môžu prekrývať, čo nám môže mylne klasifikovať správania – správanie založené na rýchlom hádaní sa nachádza v rozdelení správania založenom na riešenie otázky a opačne. Keďže sme dostali prah (3s)

z viacerých metód, tak predpokladáme, že tento prah bude lepším ukazovateľom rozdelenia dvoch správaní.

Pri skupine úloh s viacerými správnymi odpoveďami to také jasné nie je. Časy odozvy prudko narastajú krátko po začatí úlohy, ako to je v prvej skúmanej skupine úloh. Očakávali sme, že rozdelenie časov odozvy bude iné, keďže testujúci potrebujú viacej času na splnenie úlohy. Oproti prvej skupine, druhá skúmaná skupina má značný počet nesprávnych odpovedí. Myslíme si, že príčina krátkych časov odozvy a vysoká početnosť nesprávnych odpovedí je nedostatočný čas premýšľania testujúcich alebo ich nevedomosť. Zistené prahy (3s, 5s a 2s) pri druhej skupine ukazujú rôzne výsledky, Pri 5 sekundovom prahu je rozdiel medzi mierami presnosti správaní veľmi malý. Pri 3 a 2 sekundovom prahu sú rozdiely mier presností proporcionálne lepšie. Kratší čas ako pri úlohách s jednou správnou úlohou nemôžeme prijať, keďže by mal byť dlhší alebo aspoň rovný kvôli dlhšiemu času na premyslenie úlohy. Ďalší faktor je, že na tretej sekunde odozvy je počet nesprávnych odpovedí prevyšuje počet správnych odpovedí. Z tohto hľadiska musíme určiť trojsekundový prah ako najvhodnejší bod rozdelenia dvoch správaní v skúmanej skupine úloh s viacerými správnymi odpoveďami.

Pri obidvoch skupinách sme určili trojsekundový prah ako najvhodnejší. Rovnako sme použili metódu s trojsekundovým spoločným prahom pre všetky úlohy. Je to najjednoduchšia metóda a jej využitie je práve vhodné pri veľkom počte úloh, napríklad v online prostredí. Použitie zistených metód a prahov v online vzdelávacom prostredí nám môže zistiť typy testujúcich a ďalej personifikovať prostredie, aby vyhovoval danému testujúcemu, čo najviac.

Na testovanie prahov sme použili mieru presnosti na dvoch skúmaných správaniach. Miera presnosti je dobrý indikátor zmeny správania sa v úlohách a tiež má potenciál byť ako metóda na zistenie správneho časového prahu medzi dvoma správaniami.

Použitá literatúra

[1] WISE, Steven L. Rapid-Guessing Behavior: Its Identification, Interpretation, and Implications. *Educational Measurement: Issues and Practice* [online]. 2017, **36**(4). ISSN 17453992. Dostupné z: doi:10.1111/emip.12165

[2] SCHNIPKE, Deborah L. Assessing Speededness in Computer-Based Tests Using Item Response Times. In: [online]. 1995. Dostupné z: https://api.semanticscholar.org/CorpusID:142116068

[3] WISE, Steven L. a Xiaojing KONG. *Response time effort: A new measure of examinee motivation in computer-based tests* [online]. 2005. ISSN 08957347. Dostupné z: doi:10.1207/s15324818ame1802_2

[4] WISE, Steven L. An investigation of the differential effort received by items on a low-stakes computer-based test. *Applied Measurement in Education* [online]. 2006, **19**(2). ISSN 08957347. Dostupné z: doi:10.1207/s15324818ame1902_2

[5] WISE, Steven L. a Christine E. DEMARS. An application of item response time: The effort-moderated IRT model. *Journal of Educational Measurement* [online]. 2006, **43**(1). ISSN 00220655. Dostupné z: doi:10.1111/j.1745-3984.2006.00002.x

[6] WISE, Steven L., Dennison S. BHOLA a Sheng Ta YANG. Taking the time to improve the validity of low-stakes tests: The effort-monitoring CBT. *Educational Measurement: Issues and Practice* [online]. 2006, **25**(2). ISSN 07311745. Dostupné z: doi:10.1111/j.1745-3992.2006.00054.x

[7] DEMARS, Christine E. Changes in rapid-guessing behavior over a series of assessments. *Educational Assessment* [online]. 2007, **12**(1). ISSN 10627197. Dostupné z: doi:10.1207/s15326977ea1201_2

[8] EL-SEOUD, M. Samir Abou, Mahmoud EL-KHOULY a Islam A.T.F. TAJ-EDDIN. Strategies to enhance learner's motivation in e-learning environment. In: *Proceedings of 2015 International Conference on Interactive Collaborative Learning, ICL 2015* [online]. 2015. Dostupné z: doi:10.1109/ICL.2015.7318154

[9] O'NEIL, Harold F., Jamal ABEDI, Judy MIYOSHI a Ann MASTERGEORGE. *Monetary incentives for low-stakes tests* [online]. 2005. ISSN 10627197. Dostupné z: doi:10.1207/s15326977ea1003_3

[10] GHOFUR, Abd. a Ety YOUHANITA. Interactive Media Development to Improve Student Motivation. *IJECA (International Journal of Education and Curriculum Application)* [online]. 2020, **3**(1). Dostupné z: doi:10.31764/ijeca.v3i1.2026

[11] WISE, Steven L. a G. Gage KINGSBURY. Modeling Student Test-Taking Motivation in the Context of an Adaptive Achievement Test. *Journal of Educational Measurement* [online].

2016, **53**(1). ISSN 17453984. Dostupné z: doi:10.1111/jedm.12102

[12] ISKANDAR, Adi Panca Saputra, Made SUDARMA a Komang Oka SAPUTRA. Nonformal Test-Based Gamification Model to Improve Student Motivation. In: *2018 International Conference on Smart Green Technology in Electrical and Information Systems: Smart Green Technology for Sustainable Living, ICSGTEIS 2018 - Proceeding* [online]. 2018. Dostupné z: doi:10.1109/ICSGTEIS.2018.8709145

[13] WISE, Steven L., Dena A. PASTOR a Xiaojing J. KONG. Correlates of rapid-guessing behavior in low-stakes testing: implications for test development and measurement practice. *Applied Measurement in Education* [online]. 2009, **22**(2). ISSN 08957347. Dostupné z: doi:10.1080/08957340902754650

[14] LANCASTER, Thomas a richard WILKINSON. Improving Student Motivation Using Technology Within The STEM Disciplines. In: . 2014.

[15] HALKITIS, Perry N., J. Patrick JONES a Jitendra PRADHAN. Estimating Testing Time: The Effects of Item Characteristics on Response Latency. In: *Annual Meeting of the American Educational Research Association*. 1996.

[16] KONG, Xiaojing J., Steven L. WISE a Dennison S. BHOLA. Setting the response time threshold parameter to differentiate solution behavior from rapid-guessing behavior. *Educational and Psychological Measurement* [online]. 2007, **67**(4). ISSN 15523888. Dostupné z: doi:10.1177/0013164406294779

[17] WISE, Steven L, Lingling MA, G Gage KINGSBURY a Carl HAUSER. An investigation of the relationship between time of testing and test-taking effort. *National Council on Measurement in Education*. 2010. ISSN 00472506.

[18] MEYER, J. Patrick. A mixture rasch model with item response time components. *Applied Psychological Measurement* [online]. 2010, **34**(7). ISSN 01466216. Dostupné z: doi:10.1177/0146621609355451

[19] PASTOR, Dena A., Thai Q. ONG a Scott N. STRICKMAN. Patterns of Solution Behavior across Items in Low-Stakes Assessments. *Educational Assessment* [online]. 2019, **24**(3). ISSN 10627197. Dostupné z: doi:10.1080/10627197.2019.1615373

[20] WISE, Steven L. a Lingling MA. Setting response time thresholds for a CAT item pool: the normative threshold method. In: *Paper presented at the 2012 annual meeting of the National Council on Measurement in Education*. 2012.

[21] GUO, Hongwen, Joseph A. RIOS, Shelby HABERMAN, Ou Lydia LIU, Jing WANG a Insu PAEK. A New Procedure for Detection of Students' Rapid Guessing Responses Using Response Time. *Applied Measurement in Education* [online]. 2016, **29**(3). ISSN 08957347. Dostupné z: doi:10.1080/08957347.2016.1171766

[22] GOLDHAMMER, Frank, Thomas MARTENS, Gabriela CHRISTOPH a Oliver LÜDTKE. Test-taking engagement in PIAAC. *OECD Education Working Papers*. 2016, (133). ISSN 1993-9019.

[23] SCHNIPKE, Deborah L. a David J. SCRAMS. Exploring issues of examinee behavior: Insights gained from response-time analyses. In: *Computer-Based Testing: Building the Foundation for Future Assessments* [online]. 2005. Dostupné z: doi:10.4324/9781410612250-20

Vplyv teploty a zloženia na tavenie sklokeramických glazúr

Influence of temperature and composition on the melting of glass-ceramic glazes

Marián Žilinec [1]
Školiteľ: Anton Trník[1]
[1]Katedra fyziky, FPVaI UKF, Tr. A. Hlinku 1, 949 01 Nitra
marian.zilinec@ukf.sk, atrnik@ukf.sk

Abstrakt
Sklokeramické glazúry dosahujú lepšie mechanické a elektrické vlastnosti ako klasické glazúry. Napriek tomu sa doteraz nepoužívali na povrchovú úpravu vysokonapäťových izolátorov. Na výrobu sklokeramickej glazúry je potrebné roztaviť zmes prekurzorov a následne ju rýchlo ochladiť, aby sa vytvorili takzvané frity. Frity sú potom východiskovým materiálom pre budúce glazúry. Preto je dôležité, aby chemické zloženie zodpovedalo chemickému zloženiu budúcej sklokeramickej glazúry. Na zníženie energie pri nanášaní glazúry sa používa jednokrokový výpal, pri ktorom sa suspenzia nanesie na surový izolátor a potom sa izolátor vypáli spolu s glazúrou. Cieľom tohto článku je skúmanie vplyvu teploty a zloženia na tavenie sklokeramických glazúr.

Kľúčové slová: sklokeramické glazúry, teplota topenia, pozorovacia pec, albit, kordierit

Abstract
Glass-ceramic glazes achieve better mechanical and electrical properties than traditional glazes. Nevertheless, they have not been used for the surface treatment of high-voltage insulators so far. For the production of glass-ceramic glaze, it is necessary to melt the precursor mixture and then quickly cool it to form the so-called frits. Then, frits are the starting material for future glazes. Therefore, it is important that the chemical composition of the initial mixture is consistent with the chemical composition of the future glass-ceramic glaze. To reduce the energy for the applying of the glaze, a one-step firing is used, where the suspension is applied to the raw ceramic body of the insulator and then the insulator is fired together with the glaze. The aim of this study is to investigate the influence of temperature and composition on the melting of glass-ceramic glazes.

Key Words: glass-ceramic glazes, melting temperature, observation furnace, albite, cordierite

Úvod

Termofyzikálne, mechanické a elektrické vlastnosti sklokeramických glazúr (SKG) neboli doteraz systematicky skúmané. Je preto nutné významne rozšíriť dané poznatky. Získané výsledky môžu objasniť zložité fázové premeny a interakcie medzi keramickým materiálom a sklokeramickou glazúrou vo vzťahu k vlastnostiam konečného produktu. Tiež je nutné sa zaoberať aj ekonomickými, bezpečnostnými a environmentálnymi aspektmi navrhnutých materiálov.

Dosiahnuté výsledky v rámci danej vedeckej témy môžu pomôcť dôkladne pochopiť fyzikálne pozadie vývoja mikroštruktúry v keramických, resp. v sklokeramických kompozitoch, čím následne môžu viesť k návrhu inovatívnych vysokonapäťových keramických izolátorov vyznačujúcich sa dobre regulovateľnými vlastnosťami. Okrem toho aj nový prístup k hydrofobizácii povrchov plazmovým nástrekom môže pomôcť prekonať nevýhody bežných hydrofóbnych povlakov na báze polymérov súvisiace s ich stabilitou. Daný výskum môže prispieť k vývoju nových glazúr na vysokonapäťové izolátory (VN).

1 Vysokonapäťové izolátory

Vysokonapäťové izolátory sú kľúčovými komponentmi v elektrických distribučných a prenosových sieťach. Sú potrebné na distribúciu elektrickej energie na veľké vzdialenosti pri vysokých napätiach až do 1000 kV s cieľom znížiť straty [1]. Izolátory sa používajú na oddelenie vysokonapäťového vedenia od nosnej konštrukcie a ich cena sa môže pohybovať v rozmedzí 5% až 10% celkovej ceny distribučnej siete [1].

Dobré izolátory by mali mať nízku elektrickú vodivosť, nízke dielektrické straty, vysokú dielektrickú pevnosť, vysokú chemickú odolnosť a vysokú mechanickú pevnosť [2]. Porcelán je už viac ako 150 rokov najpoužívanejším materiálom na výrobu vonkajších izolátorov vďaka svojej priaznivej kombinácii vlastností a spoľahlivosti [3,4]. Napriek tomu, že sa porcelánové izolátory občas označujú za zastarané, sú z hľadiska výroby, spoľahlivosti a

trvanlivosti pokrokové a iné materiály ich len tak neprekonajú [3].

2 Glazúry

Fyzikálne vlastnosti porcelánových izolátorov sa ďalej zlepšujú nanesením vhodnej povrchovej vrstvy - hladkého sklovitého materiálu nazývaného glazúra, ktorá zvyšuje čistiteľnosť povrchu (keďže glazúry majú hladký povrch, ktorý znižuje tvorbu vodivej vrstvy rôznych znečisťujúcich látok) a zvyšuje mechanickú pevnosť izolátora [1,2]. Glazúry sa zvyčajne vyrábajú zo živca, kaolínu, kremeňa a rôznych zdrojov oxidov, ako sú CaO, BaO, ZnO, atď. [1,5,6]. V prípade glazúr pre VN izolátory by sa mal zachovať nízky obsah nečistôt (napr. olova), pretože zvyšujú elektrickú vodivosť [5].

Pri výrobe glazúr sa suroviny melú vo vode [2] a nanášajú sa (ako suspenzia) na izolátory ponorením alebo striekaním. Vlastnosti výslednej glazúry závisia od jej interakcie s porcelánovým substrátom počas výpalu [7]. Jej koeficient lineárnej teplotnej rozťažnosti by mal byť podobný alebo o niečo nižší ako koeficient teplotnej rozťažnosti substrátu, aby sa zabránilo vzniku trhlín [7] a zvýšila sa mechanická pevnosť [1,2,7,8].

V poslednom desaťročí sa uskutočnilo len niekoľko nových štúdií zaoberajúcich sa glazúrami pre VN izolátory. Najnovšie štúdie sa zameriavajú na úpravu zloženia glazúr na rýchle vypálenie [9] a na štúdium ich korózie [10]. Zdá sa, že štandardné glazúry dosiahli svoj maximálny potenciál, ale objavuje sa prístup využívajúci sklokeramické glazúry, ktorý zatiaľ nebol aplikovaný na VN izolátory.

Stručne povedané, pomocou SKG je možné účinne kontrolovať elektrickú vodivosť, chemickú odolnosť, teplotnú rozťažnosť a stabilitu, mechanickú pevnosť, tvrdosť, odolnosť proti oderu a priľnavosť k podkladu, čo vedie k menším a účinnejším izolačným produktom pri nižších nákladoch [7,11,12,13]. Okrem toho proces s jedným výpalom môže ďalej znížiť ekonomické náklady.

3 Sklokeramika a sklokeramické glazúry na izolačné využitie

Sklokeramika sa pripravuje riadenou kryštalizáciou určitého typu skla, často vyvolanou pridaním nukleačných činidiel (kryštalizačných jadier) [14]. Tendencia kryštalizovať do značnej miery závisí od chemického zloženia skla vzhľadom na zloženie (budúceho) minerálu [7]. Existujú dva základné spôsoby prípravy sklokeramiky. Prvou je objemová kryštalizácia, keď sa suroviny roztavia pri teplote viac ako 1400 °C, čím vznikne homogénne sklo, ktoré sa potom riadeným spôsobom ochladí na teplotu maximálnej rýchlosti nukleácie a následne sa zahreje na teplotu maximálnej rýchlosti rastu zŕn. Druhou metódou je spekaná kryštalizácia, keď sa roztavené sklo ochladzuje a následným mletím sa pripravujú tzv. frity.

Z fritov sa vytvorí budúci výrobok, ktorý sa postupne zahrieva na teploty i) spekania fritov, ii) maximálnej rýchlosti nukleácie a iii) rastu zŕn. Výsledná sklokeramická mikroštruktúra závisí najmä od počtu, typu a množstva kryštalických fáz, veľkosti kryštalitov a ich vzájomnej orientácie a od toho, či je kryštalizácia kongruentná. Je teda zrejmé, že aj pri nezmenenom celkovom chemickom zložení môže výsledné vlastnosti ovplyvniť niekoľko ďalších do značnej miery nezávislých faktorov.

Základné možnosti riadenia mikroštruktúry sklokeramiky sú tieto: podiel kryštalických zložiek (chemické zloženie, režim výpalu) a nukleačné činidlá (napr, TiO2)); zhodnosť kryštalizácie (chemické zloženie [15]); počet rôznych kryštalických fáz (chemické zloženie, režim výpalu, nukleačné činidlá [16], mechanizmus nukleácie a povrchová kryštalizácia [17]); veľkosť kryštalitov (režim výpalu, viskozita sklovitej fázy a nepriamo chemické zloženie východiskového skla); počet kryštalitov (režim výpalu, povrch, podiel kryštalickej fázy a veľkosť kryštalitov); orientácia kryštalitov (povrchové [18], elektrické a/alebo magnetické [19] a teplotné gradienty [18,20]).

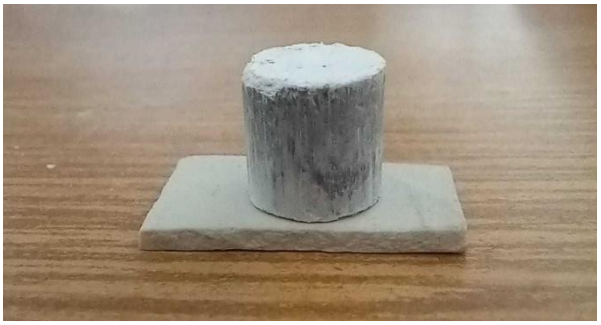
Takto možno dedukovať, že základným prístupom pre vývoj sklokeramických materiálov je kontrola procesu nukleácie (povrchovej aj objemovej).

Použitie SKG je podobné ako pri bežných glazúrach, ale spekanie sa musí dokončiť pred začiatkom kryštalizácie, aby sa získala hustá štruktúra s nízkou pórovitosťou a vysokou kryštalinitou [21,22]. Väčší počet malých kryštalitov vytvorených v materiáli zvyčajne zlepšuje jeho konečné vlastnosti.

Sklokeramickým substrátom pre elektrické aplikácie sa venuje málo pozornosti (napr. [23,24,25]), ale nedávne štúdie ukazujú, že je možné vyrábať materiály s vynikajúcimi dielektrickými vlastnosťami a vysokým obsahom kryštálov [23]. Fuertes et al. [26] navrhli dva sklokeramické materiály na báze anortitu a albitu, pričom kryštalická zložka v oboch prípadoch predstavuje viac ako 91 obj.%. Vysoký podiel kryštalickej fázy a charakteristická polykryštalická štruktúra podporujú procesy rozptylu nosičov náboja, čo vedie k pozastaveniu dielektrického prierazu v porovnaní s bežnou keramikou. Význam fázových rozhraní pre elektrické vlastnosti bol zdôraznený aj v [27,28].

4 Vzorky

Vzorky pre tento výskum boli vyrobené zmiešaním vstupných surovín vo vopred stanovenom pomere (Tab. 1 a Tab. 2) a následne boli zhomogenizované. Takto namiešané vzorky boli nasypané do kovovej formy a zlisované pod tlakom 2 bary. Ukážka zlisovanej vzorky je na Obr. 1.



Obr. 1 Zlisovaná vzorka pripravená na tavenie

4.1 Albit

Ako prvé boli skúmané vzorky albitu, ktorý bol identifikovaný ako vhodný materiál na prípravu SKG. Vzorky boli pripravené vo viacerých zloženiach (Tab. 1). Rozmery vzoriek po lisovaní boli Ø5.5 × 8 mm^2. Následne vzorky boli vypaľované v elektroodporovej peci na teplotu 1350 °C s 2-hodinovou výdržou.

Tab. 1 Zloženie skúmaných vzoriek na báze albitu (hm.%)

Názov vzorky	SiO_2	Al_2O_3	CaO	MgO	Na_2O	K_2O	ZrO_2	ZnO	TiO_2
8.7	60,82	20,13	2,90		12,61	3,54			
8.7.a	61,71	20,42		1,47	12,80	3,60			
8.7.a.b	60,34	19,38		1,16	12,04	3,54	3,54		
8.7.a.c	64,02	19,99		1,19	12,42				2,36
8.9	50,07	24,86		2,89	19,85			2,33	
8.9.a	50,10	24,87		2,89	19,85				2,29

4.2 Kordierit

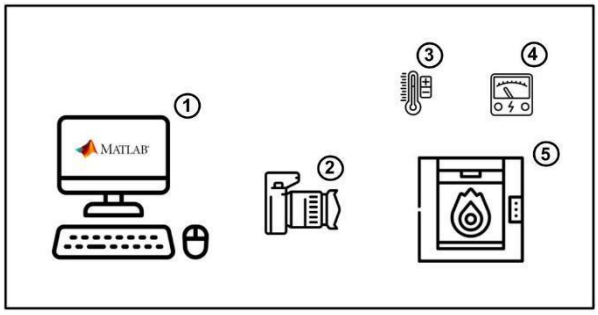
Vzorky kordieritu boli pripravené vo viacerých zloženiach (Tab. 2), pričom vzorka G2.1 obsahovala ideálny pomer MgO/CaO [29]. Rozmery vzoriek po lisovaní boli Ø8 × 10 mm^2. Vzorky boli následne vypaľované v taviacej peci na teplotu 1350 °C s 1-hodinovou výdržou.

Tab. 2 Zloženie skúmaných vzoriek na báze kordieritu (hm.%)

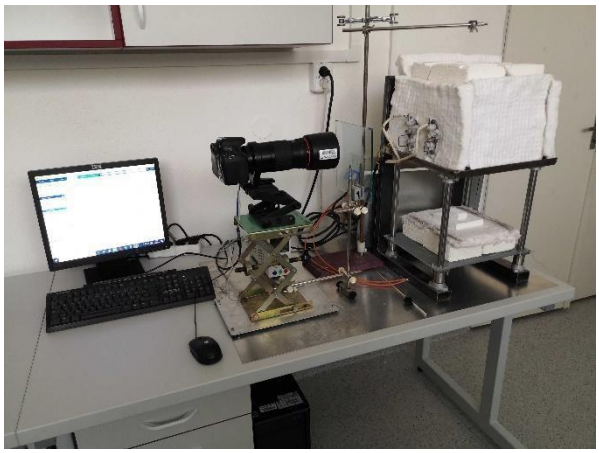
Názov vzorky	SiO_2	Al_2O_3	CaO	MgO	B_2O_3	TiO_2
G2.1	55,01	21,57	4,66	11,99	2,91	3,85
G2.14	43,79	24,70	1,40	18,70		11,41
G2.17	51,90	30,12	1,74	11,91	4,33	
G2.18	51,87	30,10	3,49	11,90	2,64	
G2.19	49,10	29,87	3,46	11,81	2,62	3,15
G2.20	48,91	29,75	3,44	11,76		6,13

5 Meracia aparatúra

Pri výskume bola použitá meracia aparatúra pozostávajúca z počítača s programovým vybavením Matlab (1), fotoaparátu s vysokým rozlíšením (2), regulátora teploty (3), multimetra na meranie teploty (4) a elektroodporovej pece (5) - pozri Obr. 2 a Obr. 3.



Obr. 2 Nákres použitej meracej aparatúry

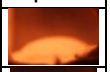
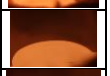


Obr. 3 Reálna fotografia použitej meracej aparatúry

Elektroodoprová pec bola riadená regulátorom teploty s nastaveným teplotným režimom: 5 °C/min do teploty 1350 °C a s výdržou 1 hodina. Pec bola napojená na počítač, ktorý pomocou multimetra a termočlánku Pt-PtRh10 v peci zaznamenával aktuálnu teplotu pece. Na pec, v ktorej bol pozorovací otvor, bol nasmerovaný

fotoaparát s vysokým rozlíšením, ktorý robil fotografie a posielal ich do počítača v 30-sekundových intervaloch.

6 Výsledky a diskusia

Názov vzorky	800° C	1200 °C	1300 °C	1350 ° C	1350 °C po 1h
G2.1					
G2.14					
G2.17					
G2.18					
G2.19					
G2.20					

Obr. 4 Priebeh spekania kordieritu pri rôznych teplotách

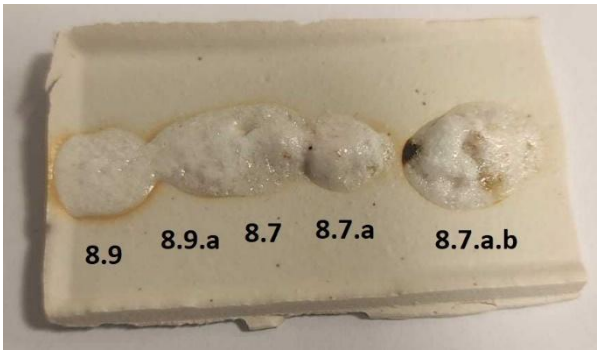
G2.1	G2.14
	
G2.17	G2.18
	
G2.19	G2.20
	

Obr. 5 Roztavené vzorky jednotlivých zmesí kordieritu

Na Obr. 4 je priebeh spekania skúmaných vzoriek kordieritu pri teplotách od 800 °C až do 1350 °C a následnej 1-hodinovej výdrže. Pri teplote 800 °C všetky sledované vzorky zachovali svoj tvar. Pri teplote 1200 °C sa tvar vzoriek nezmenil. Pri následnom náraste teploty na 1300 °C sa hrany vzoriek začali pomaly meniť. Pri teplote 1350 °C je už zakrivenie vzoriek evidentné. Vzorka G2.14 je roztavená najvýraznejšie, vzorka G2.17 najmenej.

Na Obr. 5 vidíme výsledné vzorky po vytiahnutí z taviacej pece. Vzorka G2.1 má krásnu sklovitú štruktúru. Vzorka G2.14 má taktiež sklovitú štruktúru. U ostatných vzoriek nepozorujeme sklovitú štruktúru.

Ďalšie vzorky, ktoré boli skúmané, boli na báze albitu. Tieto vzorky neboli spekané v pozorovacej peci ako kordierit. Zlisované vzorky na báze albitu sme vložili do elektroodporovej pece na teplotu 1350 °C s 2-hodinovou výdržou. Vzorky po vytiahnutí z taviacej pece (Obr. 6) nemali sklovitú štruktúru a z toho dôvodu boli vzorky na báze albitu vyhodnotené ako nevhodné pre ďalšie účely výskumu.



Obr. 6 Roztavené vzorky jednotlivých zmesí albitu

Záver

Vzorky na báze albitu boli vyhodnotené ako nevhodné na použitie pre ďalší výskum SKG. Vzorky na báze kordieritu sa javia ako vhodný materiál pre účely výskumu SKG. Existuje ideálna zmes (G2.1) so sklovitou štruktúrou a niektoré ďalšie zmesy (G2.14) sa jej približujú. Príprava ďalších variant zmesí a ich aplikácia v praktickom využití na báze kaolínu bude predmetom ďalšieho výskumu.

Poďakovanie

Táto práca bola podporená grantom Univerzitnej grantovej agentúry (UGA) Univerzity Konštantína Filozofa v Nitre, číslo grantu VII/15/2024.

Taktiež by som sa chcel poďakovať môjmu školiteľovi doc. RNDr. Antonovi Trníkovi, PhD. za jeho cenné rady a pripomienky k tejto práci, ako aj RNDr. Štefanovi Csákimu, PhD. za jeho rady pri meraniach.

Použitá literatúra

[1] MOULSON, A.J. – HERBERT, J.M. 2003. Electroceramics: Materials, Properties, Applications, 2nd Edition. John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-471-49748-6

[2] CONTREAS, Jose E. – RODRÍGUEZ, Eden A. 2017 Nanostructured insulators – A review of nanotechnology concepts for outdoor ceramic insulators. In Ceramics International, vol. 43, no. 12, pp. 8545-8550. ISSN: 0272-8842.
[3] FARZANEH, Masoud – CHISHOLM, William A. 2009. Insulators for Icing and Polluted Environments. John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-470-28234-2.
[4] LOOMS, J.S.T. 1988. Insulators for High Voltages. The Institution of Engineering and Technology, London. ISBN: 978-0-86341-116-8.
[5] LIEBERMANN, Johannes. 2012. High-Voltage Insulators: Basics and Trends for Producers, Users and Students. Schulze. ISBN: 9783877352083.
[6] HLAVÁČ, Jan. 1983. The Technology of Glass and Ceramics: An Introduction. Elsevier Scientific Publishing Company. ISBN: 9780444996886.
[7] CASASOLA, R. – RINCÓN, J.M. – ROMERO, M. 2012. Glass-ceramic glazes for ceramic tiles: A review. In Journal of Material Science, vol. 47, no. 2, pp. 553-582. ISSN: 0022-2461.
[8] EPPLER, Richard A. – EPPLER, Douglas R. 2000. Glazes and Glass Coatings. American Ceramic Society. ISBN: 9781574980547.
[9] LEVITSKII, I.A. – POZNYAK, A.I. – NADUDIK, A.A. 2015. Transparent Glazes for High-Voltage Porcelain. In Glass and Ceramics, vol. 72, no. 7-8, pp. 253-257. ISSN: 0361-7610.
[10] QIU, Zhibin et al. 2015. Study on Glaze Electrical Erosion Characteristics of Porcelain Post Insulator by Using Inclined Plane and Graphite-Layer-Based Method. In IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation, vol. 22, no. 6, pp. 3385-3394. ISSN: 1070-9878.
[11] TORRES, F.J. – ALARCÓN, J. 2004. Microstructural evolution in fast-heated cordierite-based glass-ceramic glazes for ceramic tile. In Journal of the American Ceramic Society, vol. 87, no. 7, pp. 1227-1232. ISSN: 0002-7820.
[12] GAJEK, Marcin et al. 2017. Development of anorthite based white porcelain glaze without ZrSiO4 content. In Ceramics International, vol. 43, no. 2, pp. 1703-1709. ISSN: 0272-8842.
[13] REINOSA, Julian J. et al. 2010. Sintering behaviour of nanostructured glass-ceramic glazes. In Ceramics International, vol. 36, no. 6, pp. 1845-1850. ISSN: 0272-8842.
[14] ZANOTTO, Edgar Dutra. 2010. A bright future for glass-ceramics. In American Ceramic Society Bulletin, vol. 89, no. 8, pp. 19-27. ISSN: 0002-7812.
[15] DELEEDE, G. et al. 1992. Theory for incongruent crystallization: Application to a ZBLAN glass. In Journal of Material Science, vol. 27, no. 9, pp. 2309-2315. ISSN: 0022-2461.
[16] FERRARI, AM et al. 1997. Feasibility of using cordierite glass-ceramics as tile glazes. In Journal of the American Ceramic Society, vol. 80, no. 7, pp. 1757-1766. ISSN: 0002-7820.
[17] HÖLAND, W. et al. 2003. Control of nucleation in glass ceramics. In Philosophical Transactions of The Royal Society A-Mathematical and Engineering Sciences, vol. 361, no. 1804, pp. 575-588. ISSN: 1364-503X.
[18] RUSSEL, C. 1997. Oriented crystallization of glass. A review. In Journal of Non-Crystalline Solids, vol. 219, pp. 212-218. ISSN: 0022-3093.
[19] HÖLLAND, Wolfram – BEALL, George H. 2019. Glass-Ceramic Technology, 3rd Edition. John Wiley & Sons. ISBN: 978-1-119-42369-0.
[20] OCHI, Y. – MEGURO, T. – KAKEGAWA, K. 2006. Orientated crystallization of fresnoite glass-ceramics by using a thermal gradient. In Journal of the European Ceramic Society, vol. 26, no. 4-5, pp. 627-630. ISSN: 0955-2219.
[21] KARAMANOV, Alexander – PELINO, Mario. 2006. Sinter-crystallization in the diopside-albite system. Part II. Kinetics of crystallization and sintering. In Journal of the European Ceramic Society, vol. 26, no. 13, pp. 2519-2526. ISSN: 0955-2219.
[22] RASTERIO, M.G. et al. 2007. Crystalline phase characterization of glass-ceramic glazes. In Ceramics International, vol. 33, no. 3, pp. 345-354. ISSN: 0272-8842.
[23] FUERTES, V. et al. 2018. Hierarchical micro-nanostructured albite-based glass-ceramic for high dielectric strength insulators. In Journal of the European Ceramic Society, vol. 38, no. 7, pp. 2759-2766. ISSN: 0955-2219.
[24] SACCANI, A et al. 1996. Electrical properties and microstructure of glass-ceramic materials from CaO-MgO-Al2O3-SiO2 system. In Journal of Materials Science, vol. 31, no. 22, pp. 5993-5998. ISSN: 0022-2461.
[25] ZHU, Haikui et al. 2009. Low temperature sintering and properties of CaO-B2O3-SiO2 system glass ceramics for LTCC applications. In Journal of Alloys and Compounds, vol. 482, no. 1-2, pp. 272-275. ISSN: 0925-8388.
[26] FUERTES, V. et al. 2019. Microstructural study of dielectric breakdown in glass-ceramics insulators.

In Journal of the European Ceramic Society, vol. 39, no. 2-3, pp. 376-383. ISSN: 0955-2219.
[27] TOUZIN, M. et al. 2010. Alumina based ceramics for high-voltage insulation. In Journal of the European Ceramic Society, vol. 30, no. 4, pp. 805-817. ISSN: 0955-2219.
[28] OWATE, IO – FREER, R. 1990. The electrical properties of some cordierite glass ceramics in the system MgO-Al2O3-SiO2-TiO2. In Journal of Materials Science, vol. 25, no. 12, pp. 5291-5297. ISSN: 0022-2461.
[29] TORREW, Francisco Jose – ALARCÓN, Javier. 2005. Effect of MgO/CaO ratio on the microstructure of cordierite-based glass-ceramic glazes for floor tiles. In Ceramics International, vol. 31, no. 5, pp. 683–690. ISSN 0272-8842.